

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung Biochemie
Leiter: Prof. Dr. Dr. Hans Kröger

Nikotinamidmethylierung in normalen Geweben
und Tumorzellen von Ratte und Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
ROLAND SEIFERT
aus Berlin

UBR069025302042



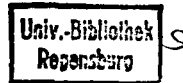
T 8 6 / 1 0 7 2

23/X 6377773

2

Referent: Prof. Dr. Dr. Hans Kröger

Korreferent: Prof. Dr. Wolfram Christ



6377773

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11. 4. 86

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

1. Seifert, R. & Hoshino, J. (1983)

Methylation of Nicotinamide in Normal Rat Tissues, in Rat Tissues During the Ontogenic Development and in Neoplasms of Widely Different Growth Rate.

Poster auf dem "2. European Workshop on ADP-Ribosylation of Proteins", 26.-28.05.1983, Berlin

2. Seifert, R., Hoshino, J. & Kröger, H. (1984)

Nicotinamide Methylation. Tissue Distribution, Developmental and Neoplastic Changes.

Biochimica et Biophysica Acta 801, 259-264

3. Hoshino, H., Seifert, R., Knefel, G. & Kröger, H. (1985)

Nicotinamide Methylation: Its Physiological Significance in Hepatocellular Proliferation and Tumor Malignancy.

Poster auf dem internationalen Kongreß: "The Biochemistry of S-Adenosylmethionine as a Basis for Drug Design", 30.06.-04.07.1985, Bergen/Norwegen

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. EINLEITUNG	7
1.1. Stoffwechsel und physiologische Bedeutung des Nikotinamid	7
1.2. Biochemische Funktion des NAD	14
1.3. Biochemische Funktion der Nikotinamidmethylierung	19
1.4. Motivation und Intention der Arbeit	29
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1. Biologisches Ausgangsmaterial	32
2.1.1. Versuchstiere und Tierhaltung	32
2.1.2. Transplantation und Gewinnung der Ascitestumorzellen	32
2.1.3. Gewinnung der Organe von Ratte und Maus	33
2.1.4. Blutserumgewinnung	34
2.1.5. Transplantation und Gewinnung der Rattenhepatome	34
2.1.6. Kultur der RLC-Zellen	35
2.2. Biochemisch-analytische Methoden	37
2.2.1. Bestimmung der Nikotinamidmethylaseaktivität	37
2.2.1.1. Präparation der Gewebeextrakte für den Nikotinamid- methylaseassay	37
2.2.1.2. Nikotinamidmethylaseassay	38
2.2.2. Inkorporation von [Carbonyl- ¹⁴ C]Nikotinamid in das [¹⁴ C]NAD und [¹⁴ C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen und in Zellkulturen mit Ascitestumorzellen sowie RLC-Zellen	40
2.2.3. Biosynthese von NAD aus nichtradioaktivem Nikotinamid in Zellkulturen mit Ascitestumorzellen	43
2.2.4. Bestimmung der NAD-Konzentration in Geweben und in Ascites- tumorzellen	43
2.2.5. Proteinbestimmung	44
2.2.6. Zellzählung	45
2.2.7. Chemikalien	45
3. ERGEBNISSE	48
3.1. Nikotinamidmethylierung in verschiedenen normalen Organen der erwachsenen Ratte und Maus	48
3.1.1. Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität in normalen Organen der Ratte und der Maus	48

3.1.2. Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit normalen Organen der Ratte und der Maus	50
3.1.3. Verteilung der NAD-Konzentration in normalen Organen der Ratte und der Maus	56
3.2. Veränderung der Nikotinamidmethylierung während der fetalen und postnatalen Entwicklung	59
3.2.1. Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung	59
3.2.2. Veränderung der Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung	62
3.2.3. Veränderung der NAD-Konzentration in Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung	66
3.2.4. Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn der Maus während der fetalen und postnatalen Entwicklung	69
3.3. Nikotinamidmethylierung in Tumoren	71
3.3.1. Nikotinamidmethylierung in anaplastischen non-hepatischen Ascitestumorzellen und in den Lebern der tumortragenden Tiere	71
3.3.2. Biosynthese von NAD aus nichtradioaktivem Nikotinamid in Zellkulturen mit anaplastischen non-hepatischen Ascitestumorzellen	74
3.3.3. Nikotinamidmethylierung in Rattenhepatomen	76
3.3.3.1. Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität in Rattenhepatomen mit unterschiedlicher Wachstumsrate und in den Lebern der tumortragenden Ratten	76
3.3.3.2. Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit soliden Rattenhepatomen und in Zellkulturen mit Asciteshepatomzellen	84
3.4. Nikotinamidmethylierung in RLC-Zellen	89
3.4.1. Nikotinamidmethylaseaktivität in RLC-Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen	89
3.4.2. Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Zellkulturen mit RLC-Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase	96

4. DISKUSSION	101
4.1. Biochemische Bedeutung und Funktion der Nikotinamid- methylierung im Nikotinamidstoffwechsel der normalen erwachsenen Leber und der non-hepatischen Organe	101
4.2. Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylierung und dem Stoffwechsel von S-Adenosylmethionin in normalen Geweben und Tumoren	108
4.3. Nikotinamidmethylierung und hepatozelluläre Proliferation: Korrelation zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der Wachstums- bzw. DNA-Syntheserate in der Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung, in RLC- Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen sowie in einem Spektrum von Rattenhepatomen und Ascitestumoren	110
4.4. Biochemische Bedeutung und Funktion der sich während der fetalen und postnatalen Entwicklung verändernden Nikotin- amidmethylaseaktivität verschiedener Organe im Nikotin- amidstoffwechsel	114
4.5. Pathobiochemische Bedeutung der veränderten Nikotinamid- methylierung in Rattenhepatomen und Ascitestumorzellen unterschiedlicher Malignität sowie in den Lebern der tumortragenden Tiere im Nikotinamidstoffwechsel	118
5. ZUSAMMENFASSUNG	126
6. LITERATURVERZEICHNIS	129
7. DANKSAGUNGEN	167
8. LEBENSLAUF	168

1. EINLEITUNG

1.1. Stoffwechsel und physiologische Bedeutung des Nikotinamid

Nikotinamid und Nikotinsäure sind für die Mammalia ein Vitamin und müssen daher mit der Nahrung zugeführt werden. Nikotinamid ist in den meisten Nahrungsquellen, wenn auch in recht unterschiedlicher Konzentration, enthalten (Bernofsky, 1980; Buddecke, 1980a; Dietrich, 1971; Kating & Drephal, 1974; Löffler et al., 1979a). Nach der Resorption im Dünndarm durch passive und erleichterte Diffusion (Sadoogh-Abasian & Evered, 1980) gelangen Nikotinamid und Nikotinsäure in das Portalvenenblut (Collins & Chaykin, 1972). In Abbildung 1 ist der Nikotinamidstoffwechsel dargestellt. Die Pfeile 14 und 15 symbolisieren die Resorption von Nikotinsäure und Nikotinamid im Darm. Nach der Leberpassage können Nikotinamid und Nikotinsäure von allen Organen aus dem Blut aufgenommen und zur Biosynthese der Pyridinnucleotide NAD und NADP verwendet werden (Collins & Chaykin, 1972; Gerber & Deroo, 1970; Ichiyama et al., 1967a, 1967b). Nikotinsäure wird zum großen Teil bereits in der Leber zum Nikotinamid metabolisiert, das wiederum in das Blut abgegeben wird. Somit erscheint der Hauptanteil des Vitamins in Form des Nikotinamids in der systemischen Zirkulation (Dietrich et al., 1968a; Olivera & Ferro, 1982; Streffer, 1975).

Der Stoffwechsel des Nikotinamids ist ausgesprochen komplex und wird durch vielschichtige Kontrollsysteme reguliert. Es gibt große quantitative und qualitative Unterschiede im Nikotinamidstoffwechsel nicht nur bei den verschiedenen Spezies, sondern auch in den verschiedenen Geweben und Zellarten (Kating & Drephal, 1974; Olivera & Ferro, 1982). Es können an dieser Stelle nur die wichtigsten Stoffwechselwege des Nikotinamidsgenannt werden:

Nikotinamid kann direkt im sogenannten "Nikotinamidweg" unter Verbrauch von 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat zum Nikotinamidmononucleotid transformiert werden, das dann mit dem AMP-Anteil von ATP zum NAD (Nikotinamidadenin-dinucleotid) kondensiert wird (Reaktionen 1 und 2 in Abbildung 1; Dietrich et al., 1966; 1968b). In einer Vielzahl von Arbeiten mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen wurde deutlich gezeigt, daß dieser NAD-Syntheseweg in den allermeisten Organen von Ratte und Maus, in den meisten kultivierten Säugerzelllinien in der Zellkultur und auch in vielen

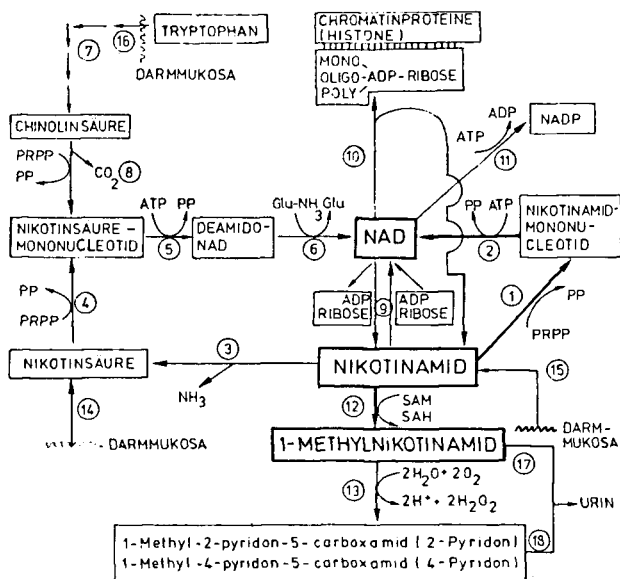


Abb. 1: Stoffwechsel des Nikotinamid

Enzyme :

1. Nikotinamidmononucleotidpyrophosphorylase [E.C. 2.4.2.12.]
2. NAD-Pyrophosphorylase [E.C. 2.7.7.1.]
3. Nikotinamiddeamidase [E.C. 3.5.1.19.]
4. Nikotinsäurephosphoribosyltransferase [E.C. 2.4.2.11.]
5. NAD-Pyrophosphorylase [E.C. 2.7.7.1.]
6. NAD-Synthetase [E.C. 6.3.5.1.]
7. 5 enzymatische und 1 nicht enzymatische Reaktion(en)
8. Chinolinsäuretransphosphorylase
9. NAD-Glycolydhrolase [E.C. 3.2.2.5.]
10. ADP-Ribosyltransferase
11. NAD-Kinase [E.C. 2.7.1.23.]
12. Nikotinamid : S-Adosylmethionin Methyltransferase [E.C. 2.1.1.1.]
13. Aldehydoxidase [E.C. 1.2.3.1.] Xanthinoxidase [E.C. 1.2.3.2.]

Abkürzungen :

- SAM** : S-Adosylmethionin
- SAH** : S-Adosylhomocystein
- NAD** : Nikotinamid-adeninucleotid
- NADP** : Nikotinamid-adeninucleotid-phosphat
- PP** : Pyrophosphat
- PRPP** : 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat
- Glu** : Glutaminsäure
- Glu-NH₃** : Glutamin

Tumorzellarten im Vergleich zu den anderen weiter unten dargestellten möglichen NAD-Synthesewegen bei weitem die quantitativ größte physiologische Bedeutung hat (Berger et al., 1982; Collins & Chaykin, 1972; Dietrich, 1971; Dietrich et al., 1965, 1966, 1968b; Gardner et al., 1972; Greenbaum & Pinder, 1968; Grunicke et al., 1969; Hillyard et al., 1973; Keller et al., 1971; McDonald & Stewart, 1967; Petrack et al., 1966).

Außerdem können Nikotinamid nach der Desaminierung zur Nikotinsäure (Reaktion 3 in Abbildung 1) oder die resorbierte Nikotinsäure selbst im "Nikotinsäureweg" über das Nikotinsäuremononucleotid und Deamido-NAD in das NAD eingebaut werden, wobei L-Glutamin als Aminogruppendonator fungiert (Reaktionen 4, 5 und 6 in Abbildung 1) (Preiss & Handler, 1958a; 1958b). Dieser Stoffwechselweg spielt jedoch in den meisten Zellarten quantitativ eine weniger bedeutsame Rolle als der Nikotinamidweg; ersterer ist vielmehr eine differenzierte Funktion einiger weniger Organe wie z.B. der Leber (Dietrich, 1971; Dietrich et al., 1968b; Hillyard et al., 1973; Jacobson et al., 1979; Olivera & Ferro, 1982; Rechsteiner & Hill, 1975).

Einige Autoren nehmen an, daß die Leber in der Regulation der systemischen Nikotinamidserumkonzentration eine wichtige homöostatische Funktion für den Gesamtorganismus hat, um alle Organe optimal und gleichmäßig mit diesem Vitamin zu versorgen (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Dietrich et al., 1968a; Gholson, 1968; Kating & Drephal, 1974; Olivera & Ferro, 1982). Die für verschiedene Gewebe und Blutserum als physiologisch ermittelten Nikotinamidkonzentrationen liegen dabei in einem Bereich von 5 - 100 μM bzw. nmol/g Gewebefrischgewicht (Bernofsky, 1980; Buddecke, 1978b; Clark et al., 1975a; Gerber & Deroo, 1970; Grunicke et al., 1969; Hoshino et al., 1982a; Keller et al., 1971; Märki & Greengard, 1966).

Falls Nikotinamid in unzureichender Menge mit der Nahrung aufgenommen wird, kann die essentielle Aminosäure Tryptophan als Provitamin (Resorption im Intestinaltrakt = Pfeil 16 in Abbildung 1) hauptsächlich in der Leber und in der Niere zur Chinolinsäure metabolisiert werden (Reaktionsfolge 7 in Abbildung 1), die dann in das NAD eingebaut werden kann (Reaktionen 8, 5 und 6 in Abbildung 1), um die Versorgung des Organismus mit Pyridinringverbindungen zu gewährleisten (Goldsmith, 1965; Goldsmith et al., 1961; Hankes et al., 1948; Harris & Kodicek, 1950; Horvitt et al., 1956; Ichiyama et al., 1967a, 1967b; Krehl et al., 1945a, 1945b, 1964; Löffler et al.,

1979b; Morrison et al., 1963; Oesterling & Rose, 1952; Olivera & Ferro, 1982; Patterson & Harper, 1982a, 1982b; Salmon, 1947a, 1947b; Streffer, 1975). Bei der Nutzung von Tryptophan für die NAD-Synthese spielen auch hormonelle Regulationsmechanismen wie z.B. durch Corticosteroide eine wichtige Rolle (Bernofsky, 1980; Greengard et al., 1966, 1968).

Außer für die NAD-Synthese wird Nikotinamid für die Synthese von 1-Methylnikotinamid verbraucht (Reaktion 12 in Abbildung 1) (Bernofsky, 1980; Cantoni, 1951; Dietrich, 1971; Hoshino et al., 1982a, 1984; Perlzweig et al., 1943). 1-Methylnikotinamid und seine durch Oxidation entstandenen Produkte (Reaktion 13 in Abbildung 1) werden im Urin ausgeschieden (Pfeile 17 und 18 in Abbildung 1) (Chang & Johnson, 1959, 1961; Chaykin et al., 1965; Huff, 1947; Huff & Perlzweig, 1943a; Najjar & Wood, 1940). Über die Bedeutung und Funktion der Nikotinamidmethylierung wird ausführlich in 1.3. (s.S. 18) berichtet.

Es gibt - wie bereits angedeutet wurde - eine Reihe von Kontrollmechanismen auf dem systemischen und auf dem zellulären Niveau, die gewährleisten sollen, daß eine optimale Nikotinamidkonzentration den Bedarf der Zellen an Pyridinringverbindungen zur Synthese von NAD sichert, denn sowohl hyperphysiologische (pharmakologische) als auch hypophysologische Nikotinamidkonzentrationen haben schwerwiegende Folgen für den Organismus:

Nikotinamidmangel führt bei wachsenden Ratten zu einer deutlich verlangsamten Gewichtszunahme im Vergleich zu den mit ausreichend Nikotinamid ernährten Tieren (Kating & Drephal, 1974; Krehl et al., 1945a, 1945b; Patterson & Harper, 1982; Salmon, 1947a, 1947b) und bei in der Zellkultur gezüchteten Zellen zur Wachstumsinhibition sowie zu einem Absinken der intrazellulären NAD-Konzentration (Eagle, 1956; Gardner et al., 1972; Hillyard et al., 1973). Bei schwangeren Ratten führt eine Nikotinamidmangeldiät zum Absterben der Feten (Greengard et al., 1966). Bei Hunden wird durch Nikotinamidmangel die "Schwarzzungkrankheit" hervorgerufen, die u.a. durch Appetitlosigkeit, Kachexie, Diarrhoe, ulzerative Stomatitis und Muskelschwäche gekennzeichnet ist (Greengard et al., 1966; Kating & Drephal, 1974). Die entsprechende Vitaminmangelkrankheit beim Menschen ist als Pellagra (pellis aegra = kranke Haut) seit langem bekannt. Als erster assoziierte Gaspar C. Casal (1691 - 1759), Leibarzt des spanischen Königs

Ferdinand VI., in seiner medizinischen Topographie Asturiens "Historia affectionum quarundam regionis hujus familiarum" (Madrid, 1762) bestimmte Krankheitszustände in der ärmeren Bevölkerung mit deren einseitiger Ernährung von Mais, der nur sehr wenig Nikotinamid enthält (Ackerknecht, 1978, Forth et al., 1983; Hirsch, 1962a; Kating & Drephal, 1974). Francesco F. Frappoli, Ordinarius am Ospitale Maggiore in Pavia, nannte als erster den Namen dieser Vitaminmangelkrankheit in seiner 1771 in Mailand verfaßten Arbeit "Animadversiones in morbum, vulgo pelagram" (Hirsch, 1962b).

Die Pellagra ist durch allgemeine Körperschwäche, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Photodermatitis, Stomatitis, Glossitis, Gastritis, Enteritis mit Diarrhoe und Malabsorption sowie Encephalopathie mit psychotischen Symptomen, Degeneration der Hinter- und Seitenstränge des Rückenmarks und Polyneuropathie charakterisiert (Buddecke, 1978a; Kating & Drephal, 1974; Scheid, 1983; Siegenthaler, 1979; Siegenthaler et al., 1984). Nikotinamidmangel verursacht bei Kindern psychische Entwicklungsverzögerungen und Wachstumsretardierung (Vejic et al., 1956). Die Nikotinamidserumkonzentration (Kochhar, 1948; Vajic et al., 1956) und die NAD-Konzentration in der Haut (Findlay, 1963) sind bei Pellagrapatienten im Vergleich zu gesunden Personen deutlich erniedrigt.

Die biologischen Effekte hyperphysiologischer Nikotinamiddosen sind ebenfalls sehr vielfältig: Beim Menschen kann es nach längerfristiger Gabe von hohen Nikotinsäuredosen (ca. 3 - 8 g/Tag zur Therapie von Patienten mit Hypercholesterinämie) zu verschiedenen schweren Leberfunktionsstörungen kommen (Berge, 1961; Christensen et al., 1961; Mosher, 1970; Pardue, 1961; Rivin, 1959). Bei der Ratte findet man nach der längerfristigen Applikation von hohen Nikotinamiddosen Hautläsionen, Nerven- und Knochenschädigungen, Thymusatrophie, Genitalhypoplasie (Kating & Drephal, 1974), Leberfunktionsstörungen (Sturm et al, 1980), Leberverfettung und eine Wachstumshemmung (Handler & Dann, 1942; Patterson & Harper, 1982b). Die einmalige Injektion von Nikotinamid in hohen Dosen (ca. 1 - 4 mmol/kg Körpergewicht) bzw. pharmakologische Nikotinamidkonzentrationen (1 - 20 mM) hemmen das Zellwachstum sowie die Nucleinsäurebiosynthese (DNA- und/oder RNA-Synthese) in der hypertrophierenden Niere nach unilateraler Nephrektomie (Revel & Mandel, 1962), in der regenerierenden Leber nach der partiellen Hepatektomie (Hoshino et al., 1982a; Ferris & Clark, 1971, 1972; Oide, 1958;

Streffer & Scholz, 1972) sowie in verschiedenen in der Zellkultur etablierten Säugerzelllinien (Colyer et al., 1973; Hoshino et al., 1982b; Rochette-Egly et al., 1980). Pharmakologische Nikotinamidkonzentrationen führen in menschlichen Lymphozyten (Berger & Sikorski, 1980) und in kultivierten Rattenhepatozyten (Althaus et al., 1980) zu einer Stimulation des DNA-Repair nach Behandlung der Zellen mit karzinogenen Substanzen. Ferner kommt es bei einer Reihe von kultivierten Zelllinien mit 1 - 10 mM Nikotinamid im Medium zu einem Anstieg der Frequenz des Austausches von Schwesterchromatiden als Ausdruck einer chromosomalen Schädigung, die mit der durch mutagene und karzinogene Substanzen verursachten vergleichbar ist (Oikawa et al., 1980; Utakoji et al., 1979).

Eine Therapie mit Nikotinamid kann die Entwicklung einer spontan bei bestimmten genetisch prädisponierten Mäusen auftretenden Insulinitis mit einem sich konsekutiv entwickelnden Diabetes mellitus (Yamada et al., 1982) oder das Auftreten eines Diabetes, der nach Behandlung mit der diabetogenen Substanz Streptozotocin entsteht, verhindern (Lazarus & Shapiro, 1973; Rakieten et al., 1971, 1976; Schein et al., 1967). Nikotinamid beschleunigt die Entwicklung von mit Diethylnitrosamin induzierten Nierentumoren (Schoental, 1977) und die Entstehung von durch Streptozotocin induzierten Inselzelltumoren (Rakieten et al., 1971). Andererseits wird durch eine Nikotinamidbehandlung die Induktion und das Wachstum mancher Tumorarten verzögert (Matsuyama et al., 1961; Rakieten et al., 1976; Schein et al., 1967). Neben diesen onkogenen und onkoprotektiven Wirkungen antagonisiert Nikotinamid den teratogenen Effekt einer Reihe von unterschiedlich strukturierten Substanzen wie z.B. 3-Acetylpyridin (Caplan et al., 1968; Landauer, 1957), 6-Aminonikotinamid (Landauer, 1957), Insulin (Landauer, 1948), Pilocarpin (Landauer, 1953) oder Sulfanilamid (Zwilling & de Bell, 1950). Es gibt allerdings auch Hinweise dafür, daß Nikotinamid in hohen Dosen selbst teratogene Eigenschaften aufweist (Landauer, 1948; Landauer & Wakasugi, 1966). Durch Einzel- oder Mehrfachinjektion pharmakologischer Nikotinamiddosen (1 - 5 mmol/kg Körpergewicht) können eine Reihe von Enzymen wie z.B. die L-Ornithindecaboxylase [E.C. 4.1.1.17.] im Herzmuskel (Minaga et al., 1978), die hepatische L-Tryptophan: Oxygen Oxidoreduktase [E.C. 1.13.11.11.] und die Tyrosinaminotransferase [E.C. 2.6.1.5.] (Blake et al., 1967; Blake & Kun, 1971; Kröger & Grätz, 1978) induziert werden. Außerdem kann Nikotin-

amid alle Komponenten der hepatischen mikrosomalen mischfunktionellen Oxidasen und bestimmte arzneimittelmetabolisierende Enzyme induzieren (Kamat et al., 1980; Nomura et al., 1983).

Um den biochemischen Wirkungsmechanismus zu erklären, der für die vielfältigen Effekte und die Toxizität von Nikotinamid in pharmakologischer Dosierung verantwortlich ist, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, von denen die drei wichtigsten erläutert seien:

1. Einerseits wird versucht, die pharmakologischen Effekte von Nikotinamid damit zu erklären, daß diese Substanz ein sehr potenter Inhibitor der ADP-Ribosyltransferase (Reaktion 10 in Abbildung 1) ist (Colyer et al., 1973; Preiss et al., 1971; Sugimura et al., 1967). Die Bedeutung und Funktion dieses Enzyms werden in 1.2. (s.S. 15) erläutert.
2. Andererseits käme als ein weiterer Mechanismus in Betracht, daß die Methylierung des in hohen Konzentrationen angebotenen Nikotinamids zum 1-Methylnikotinamid (Reaktion 12 in Abbildung 1) zu einem weitgehenden Verbrauch der transferierbaren Methylgruppen des S-Adenosylmethionin führt, so daß nunmehr die Depletion an S-Adenosylmethionin und die gleichzeitige Akkumulation von S-Adenosylhomocystein viele andere Methylierungsprozesse wie z.B. die Methylierung von DNA und RNA inhibieren und zu konsekutiven Funktionsstörungen in der Zelle führen (Bernofsky, 1980; Buch et al., 1972; Cedrangolo & Scala, 1959; Gross & Wildenauer, 1972; Halpern et al., 1971; Hoshino et al., 1982a; Oikawa et al., 1980; Swiatek et al., 1973; Utakoji et al., 1980). Weitere Details über die Beziehungen zwischen Nikotinamidmethylierung und dem Stoffwechsel von S-Adenosylmethionin werden in 1.3. (s.S. 18) berichtet.
3. Die dritte durch experimentelle Befunde gestützte Hypothese erklärt den Wirkungsmechanismus der Nikotinamidtoxizität folgendermaßen: Pharmakologische Nikotinamiddosen hemmen die DNA- und RNA-Synthese in proliferierenden Zellen unterschiedlicher Herkunft (Colyer et al., 1973; Hoshino et al., 1982a, 1982b; Ferris & Clark, 1971, 1972; Oide, 1958; Revel & Mandel, 1962; Rochette-Egly et al., 1980; Streffer & Scholz, 1972). Parallel dazu wird das angebotene Nikotinamid unter einer ansteigenden Utilisation von 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat und ATP in

das NAD inkorporiert (Reaktionen 1 und 2 in Abbildung 1), wodurch die NAD-Konzentration ansteigt und die ATP-Konzentration absinkt (Bernofsky, 1980; Clark & Pinder, 1969; Ferris & Clark, 1972; Hoshino et al., 1982b, 1984; Revel & Mandel, 1962). Da 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat und ATP auch für die Purin- und Pyrimidinnucleotidsynthese und somit für die Biosynthese von DNA und RNA benötigt werden (Löffler et al., 1979c, 1979d), kann der inhibitorische Effekt des Nikotinamid auf die Nucleinsäurebiosynthese als eine Kompetition der Nucleinsäure- und NAD-Synthese um gemeinsam benötigte energiereiche Verbindungen zugunsten der letzteren interpretiert werden, so daß das bereits verbrauchte 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat und ATP für die Nucleinsäuresynthese nicht mehr zur Verfügung stehen (Ferris & Clark, 1972; Hoshino et al., 1984; Revel & Mandel, 1962). Die wachstumsinhibitorische Wirkung des Nikotinamid kann durch 1-Methylnikotinamid, das die NAD-Synthese hemmt, über eine Konservierung dieser energiereichen Verbindung antagonisiert werden (Hoshino et al., 1984) (s. dazu auch 1.3., S. 18).

Das Nikotinamid ist demnach in einer Schlüsselposition im Intermediärstoffwechsel, dessen Auslenkung aus der physiologischen Homöostase schwerwiegende pathobiochemische Konsequenzen für den betroffenen Organismus hat. Die beiden Hauptstoffwechselwege des Nikotinamid führen, wie Abbildung 1 illustriert, einerseits zum NAD und andererseits zum 1-Methylnikotinamid (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Hoshino et al., 1982a, 1984; Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981). Daher sollen in den nächsten beiden Abschnitten die biochemischen Funktionen von NAD und insbesondere die der Nikotinamidmethylierung erläutert werden.

1.2. Biochemische Funktion des NAD

NAD und NADP, das durch Phosphorylierung aus dem NAD hervorgeht (Reaktion 11 in Abbildung 1), dienen bei einer sehr großen Anzahl von durch Dehydrogenasen katalysierten Oxidations-Reduktionsreaktionen als Coenzyme (Löffler et al., 1979e). Die Elektronenakzeptorfunktion des NAD für die bei der Substratreduktion gewonnenen Reduktionsäquivalente ist seit den klassischen Arbeiten von Warburg & Christian (1936a, 1936b) unbestritten. Das NAD hat einen hohen Turnover mit einer kurzen Molekülhalbwertszeit, die im Bereich von ein bis zwei Stunden liegt (Hillyard et al., 1973; Kunz & Musil, 1979;

Olivera & Ferro, 1982; Rechsteiner et al., 1976). Der rasche Auf- und Abbau des NAD verläuft über einen Kreisprozess, den sog. "Pyridinnucleotidzyklus" (Gholson, 1968; Olivera & Ferro, 1982): Nikotinamid, das beim NAD-Abbau neben ADP-Ribose als Endprodukt entsteht, wird in den meisten Organen und Zellarten ohne vorhergehende Desaminierung wieder direkt im Sinne eines Recycling über das Nikotinamidmononucleotid in das NAD inkorporiert (Reaktionen 1 und 2 in Abbildung 1), um die Abbauraten des NAD zu kompensieren (Olivera & Ferro, 1982). Der Abbau von NAD zu ADP-Ribose und Nikotinamid vollzieht sich hauptsächlich auf zwei Wegen:

Einerseits wird NAD durch die NAD-Glycohydrolase abgebaut (Reaktion 9 in Abbildung 1) (Olivera & Ferro, 1982), andererseits wird NAD für die Synthese des Homopolymers Poly (ADP-Ribose) verbraucht, die durch die ADP-Ribosyltransferase katalysiert wird (Reaktion 10 in Abbildung 1) und dabei Nikotinamid freisetzt (Chambon et al., 1966; Nishizuka et al., 1967; Sugimura et al., 1967). Die Hemmung der ADP-Ribosyltransferase durch hohe Nikotinamidkonzentrationen ($> 1 \text{ mM}$) wird auch zur Erklärung der toxischen Wirkungen dieser Verbindungen herangezogen (s. dazu i. l., S. 13). Das NAD hat also neben seiner gut dokumentierten Funktion als Coenzym auch noch die eines Substrates für die ADP-Ribosyltransferase, ein chromosomales Enzym, das den Transfer des ADP-Ribose-Anteils von NAD auf nucleäre Proteine, insbesondere Histone, katalysiert, um $(\text{ADP-Ribose})_n$:Proteinkonjugate zu bilden (Hayaishi & Ueda, 1977, Hilz & Stone, 1976). Dieses Enzym findet man in den Zellkernen aller bisher untersuchten eukaryoten Zellen (Hilz & Stone, 1976). Es wird diskutiert, ob die Synthese von Poly(ADP-Ribose) für den hohen NAD-Turnover verantwortlich sei (Olivera & Ferro, 1982; Rechsteiner et al., 1976). Die genaue Funktion der Poly(ADP-Ribose)-Synthese konnte trotz sehr intensiver Forschungsanstrengungen noch nicht aufgeklärt werden. Vermutet wird eine Involvierung der ADP-Ribosyltransferase in den DNA-Reparaturmechanismus, der beispielsweise nach einer DNA-Strangbrüche induzierenden Behandlung mit Alkylantien oder UV-Strahlen aktiviert wird und zu einem massiven Anstieg der NAD-Utilisation für die Poly(ADP-Ribose)-Synthese führt (Berger et al., 1980; Gray et al., 1981; Nomura et al., 1981; Zwilling et al., 1982). Welche Bedeutung dieses Phänomen für die Genauigkeit des DNA-Repair hat, ist noch nicht endgültig bekannt. Es ist auch die Hypothese aufgestellt worden, daß die ADP-Ribosyltransferase bei verschiedenen ande-

ren Chromatinprozessen wie DNA-Rekombination, DNA-Replikation, Genexpression und bei der Zelldifferenzierung eine Rolle spielen (Bredehorst et al., 1981; Claycomb, 1976; Gartemann et al., 1981; Hiltz et al., 1978; Johnson, 1980b; Purnell et al., 1980; Shall, 1972).

Bereits Morton (1958) hatte postuliert, daß es eine umgekehrte Korrelation zwischen der Zellteilungsrate und der intrazellulären NAD-Konzentration gebe, und daß das NAD eine Kontrollfunktion über die Zellteilung und Zelldifferenzierung ausübe. In einer Reihe von Experimenten wurde gezeigt, daß bestimmte rasch proliferierende Zellen mit einer hohen DNA-Syntheserate im Vergleich zu den stationären nicht proliferierenden Zellen eine niedrigere NAD-Konzentration aufweisen:

In der fetalen und neonatalen Leber (Burch & Dippe, 1964; Caiger et al., 1962; Jedeikin et al., 1956), in der proliferierenden Leber nach der mitogen wirkenden Thioacetamidbehandlung (Hoshino et al., 1982a) und in der regenerierenden Leber nach der partiellen Hepatektomie (Ferris & Clark, 1971, 1972; Streffer & Scholz, 1972) ist die NAD-Konzentration im Vergleich zur stationären erwachsenen Leber herabgesetzt. Auch in verschiedenen in der Zellkultur etablierten Zelllinien ist die NAD-Konzentration in der logarithmischen Wachstumsphase niedriger als in der stationären Phase (Jacobson & Jacobson, 1976; Schwartz et al., 1974). Eine Reihe bösartiger Tumoren sowie mit karzinogenen Substanzen behandelte Zellen haben eine niedrigere NAD-Konzentration als normale Zellen (Clark & Greenbaum, 1966; Glock & McLean, 1957; Jedeikin & Weinhouse, 1955; Kröger, 1963; Wintzerith et al., 1961). Durch Tumoviren transformierte 3T3-Zellen haben im Vergleich zu den nicht transformierten Zellen einen reduzierten NAD-Gehalt (Schwartz et al., 1974), während in normalen und virustransformierten kultivierten Rattennierenzellen keine Unterschiede in der NAD-Konzentration, auch nicht in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, beobachtet werden (Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981). Nemeth & Dickerman (1960) fanden keine Veränderung der NAD-Konzentration in Leber, Gehirn und Milz des Meerschweinchens im Verlauf der fetalen und postnatalen Entwicklung. Schließlich wurde von Berger et al. (1982) berichtet, daß die NAD-Konzentration in menschlichen Lymphozyten, die durch Behandlung mit Phytohämagglutinin zur Proliferation stimuliert wurden, fast siebenmal höher ist als in den nicht proliferierenden Lymphozyten.

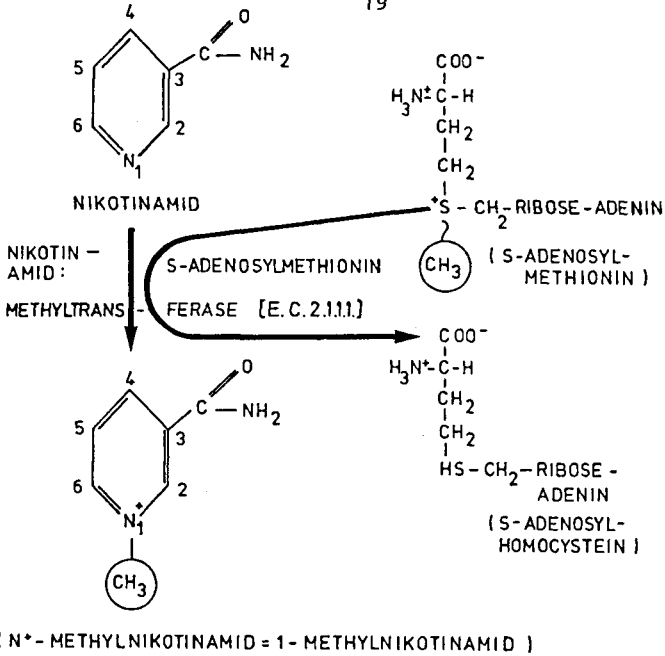
Ähnlich wie in bezug auf die zelluläre NAD-Konzentration gibt es keine allgemein gültige Korrelation zwischen der Aktivität der Poly(ADP-Ribose)-Synthese (ADP-Ribosyltransferaseaktivität, Reaktion 10 in Abbildung 1, S. 8) und der zellulären Proliferationsrate:

In verschiedenen in der Zellkultur etablierten Zelllinien kann das Maximum der ADP-Ribosyltransferaseaktivität je nach Zelltyp sowohl in der S_1 -, G_1 - oder G_2 -Phase des Zellzyklus liegen (Hayaishi & Ueda, 1977; Hilz & Stone, 1976). In transformierten Hamsterlungenzellen liegt der Aktivitätsgipfel in der G_2 -Phase (Miwa et al., 1973) ebenso in Maus-L-Zellen (Kidwell & Watts, 1974). Kultivierte LS-Zellen aus der stationären Wachstumsphase haben eine dreimal höhere Enzymaktivität als die logarithmisch proliferierenden Zellen (Stone & Shall, 1975). In der adulten Rattenleber findet man das Aktivitätsmaximum der ADP-Ribosyltransferase in der G_0 -(G_1)-Phase des Zellzyklus (Haines et al., 1969). Über das Verhalten der ADP-Ribosyltransferaseaktivität in HeLa-Tumorzellen gibt es unterschiedliche Berichte. Aktivitätsmaxima wurden sowohl in der G_1 -Phase (Smulson et al., 1971) als auch in der S-Phase des Zellzyklus (Roberts et al., 1973) festgestellt. In den rasch proliferierenden Novikoff Hepatomzellen ist die Transferaseaktivität doppelt so hoch wie in der stationären Rattenleber (Burzio & Koide, 1972), in den Yoshida Ascites Hepatomzellen AH-130 entspricht sie der Normalleberaktivität (Yamada et al., 1973), während sie in den gleichfalls rasch wachsenden Zajdela Ascites Hepatomzellen leicht erniedrigt ist (Hilz & Kittler, 1971). Leukämisch transformierte Lymphoblasten und normale phytohemagglutininstimulierte Lymphozyten haben eine wesentlich höhere ADP-Ribosyltransferaseaktivität als unstimulierte normale Lymphozyten (Burzio et al., 1975; Lehmann et al., 1974). Die fetale Rattenleber und die adulte Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie weisen eine deutlich höhere Enzymaktivität als die normale stationäre Rattenleber auf (Gill, 1972; Leiber et al., 1973). In verschiedenen kultivierten Zelllinien führt die Applikation von unterschiedlichen Inhibitoren der Zellproliferation wie z.B. Cytosinarabinsid, Hydroxyharnstoff, Streptozotocin, Cyclophosphamid, Adriamycin oder Actinomycin je nach Zellart entweder zu einem niedrigeren, gleichbleibenden oder erhöhten Aktivitätsniveau der ADP-Ribosyltransferase (Hilz & Stone, 1976; Smulson & Rideau, 1972; Whish et al., 1975).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Veränderungen des NAD- und Poly (ADP-Ribose)-Stoffwechsels in unterschiedlichen Zellen und Geweben in Abhängigkeit von der Zellteilungsrate keineswegs einheitlich sind, sondern je nach dem untersuchten Zelltyp und den Wachstumsbedingungen voneinander differieren können. Resümierend muß konstatiert werden, daß der Mechanismus, der die DNA-Replikation unter dem Einfluß von NAD reguliert, bislang unaufgeklärt bleibt, obwohl eine Involvierung der ADP-Ribosyltransferase, die NAD als Substrat für die Bildung von (ADP-Ribose)_n:Proteinkonjugaten benötigt, die DNA-Synthese vermutet wird.

1.3. Biochemische Funktion der Nikotinamidmethylierung

Nach den Pionierexperimenten von Perlzweig et al. (1943), in denen gezeigt wurde, daß Rattenleberschnitte in vitro unter aeroben Bedingungen aus Nikotinamid und Methionin 1-Methylnikotinamid synthetisieren, wurde in einer Reihe von Arbeiten bestätigt, daß Nikotinamid in der Leber methyliert wird, und daß diese Reaktion durch ein im Cytosol lokalisiertes Enzym, die Nikotinamid:S-Adenosylmethionin Methyltransferase [E.C. 2.1.1.1.] (Nikotinamidmethylase) katalysiert wird (Reaktion 12 in Abbildung 1) (Bernofsky, 1980; Cantoni, 1951, 1957; Clark et al., 1975a; Dietrich, 1971; Gholson, 1968; Hoshino et al., 1982a, 1984; Porcellati & QuagliarIELLO, 1955; Swiatek et al., 1973). Abbildung 2 zeigt den Reaktionsmechanismus der Nikotinamidmethylierung: Nikotinamid wird am Stickstoffatom des Pyridinringes methyliert (N¹-Position, im folgenden 1-Position genannt), wobei die Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin stammt, das seinerseits durch den Methylgruppentransfer zum S-Adosylhomocystein demethyliert wird. Das 1-Methylnikotinamid wird fakultativ in der Leber durch die 1-Methylnikotinamidoxidase [E.C. 1.2.3.1.] (Aldehydoxidase) oder durch die Xanthinoxidase [E.C. 1.2.3.2.] zum 2- oder 4-Pyridon oxidiert (Reaktion 13 in Abbildung 1) (Bernofsky, 1979, 1980; Felsted et al., 1973; Felsted & Chaykin, 1967; Greenlee & Handler, 1964; Hoshino et al., 1984; Kating & Drephal, 1974; Knox & Grossman, 1947; Quinn & Greengard, 1966; Rajagopalan et al., 1962; Stanulović & Chaykin, 1971). Durch die Methylierung des Pyridinstickstoffs kann das Nikotinamid an der 1-Position nicht mehr ribosyliert werden, weshalb das 1-Methylnikotinamid als biologisch inaktives Endprodukt des NAD-Stoffwechsels gilt (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Kating & Drephal, 1974; Olivera & Ferro, 1982).



1-Methylnikotinamid wird durch glomeruläre Filtration und aktive Sekretion im proximalen Tubulus der Niere im Urin ausgeschieden (Bennett et al., 1981; Berndt, 1978; Hirsch & Pakuts, 1974; Holohan & Ross, 1980; Jerauld & Siverblatt, 1978; Kinsella et al., 1979; Ross et al., 1975; Shim et al., 1982; Weiner, 1973). 1-Methylnikotinamid und seine Oxidationsprodukte wurden im Urin vieler Mammalia, u.a. beim Menschen, beim Hund, bei der Ratte und bei der Maus nachgewiesen (Pfeile 17 und 18 in Abbildung 1), wobei große quantitative Unterschiede im Ausscheidungsmuster dieser Substanzen zwischen den verschiedenen Spezies bestehen; für eine gegebene Spezies ist das quantitative Verhältnis der einzelnen ausgeschiedenen Metaboliten zueinander jedoch recht konstant (Brown & Price, 1956; Chang & Johnson, 1961; Chaykin et al., 1965; Ellinger & Abdel Kader, 1949; Felsted & Chaykin, 1967; Huff, 1947; Huff & Perlzweig, 1943a; Kating & Drephal, 1974; Knox & Grossman, 1947; Leifer et al., 1951; Najjar & Wood, 1940; Perlzweig et al., 1949; Petrack et al., 1966; Shaik et al., 1977; Stanulović & Chaykin, 1971). Ausserdem wurde gezeigt, daß 1-Methylnikotinamid auch über die Dünndarmmukosa (Turnheim & Lauterbach, 1977) und über den Schweiß (Johnson et al., 1945) ausgeschieden werden kann.

Bestimmte Autoren sind der Ansicht, daß die Nikotinamidmethylierung in der Leber eine katabolische Reaktion zur Eliminierung von überschüssigem nutritiven Nikotinamid sei, sobald der Bedarf des Organismus für dieses Vitamin gesättigt ist (Chaloupka et al., 1957; Patterson & Harper, 1982a, 1982b; Vivian et al., 1958). Da ein Nikotinamidexzess schädliche Auswirkungen für den Organismus hat (s. dazu 1.1., S. 13), soll die Nikotinamidmethylierung eine wichtige regulative Funktion bei der Aufrechterhaltung der für den Organismus optimalen Nikotinamidkonzentration im Serum und in den Geweben erfüllen, die wiederum die intrazelluläre Pyridinnucleotidkonzentration in den Geweben determiniert (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Gholson, 1968). Eine Reihe von indirekten Befunden spricht für eine solche Funktion der Nikotinamidmethylierung:

Durch einmalige intraperitoneale Injektion einer pharmakologischen Nikotinamidosis (4 mmol/kg Körpergewicht) wird in der Rattenleber ein Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität um 100 % induziert (Gholson, 1968). Die orale Gabe steigender Mengen Nikotinamid, Nikotinsäure oder Tryptophan (letzteres

als Provitamin des Nikotinamid) führt bei Ratten und Menschen zu einem proportionalen Anstieg der Serumkonzentration und der Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid im Urin (Clark et al., 1975b; Ellinger et al., 1945; Ellinger & Hardwick, 1947; Goldsmith, 1965; Hochberg et al., 1945; Mrochek et al., 1976; Patterson & Harper, 1982a, 1982b; Rosen et al., 1946; Sarrett & Goldsmith, 1947). Im Gegensatz dazu ist die 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin bei akuten und chronischen Tryptophan- bzw. Nikotinamidmangelzuständen wie z.B. bei der Pellagra deutlich erniedrigt (Brown et al., 1958; Ellinger et al., 1945; Ellinger & Hardwick, 1947; Goldsmith, 1965; Huff & Perlzweig, 1943b; Kating & Drephal, 1974; Najjar & Holt, 1941a, 1941b; Sakakida, 1956; Vivian et al., 1958). Die im Vergleich zu gesunden Probanden verringerte 1-Methylnikotinamidausscheidung bei Pellagrapatienten macht man sich auch in der Klinik als Laboratoriumsuntersuchung zur Sicherung der Diagnose zunutze, wobei der Schweregrad des klinischen Krankheitsbildes gut mit dem Grad der Verringerung der Urinausscheidung von 1-Methylnikotinamid korreliert (Buddecke, 1978b; Ellinger et al., 1945; Ellinger & Hardwick, 1947). Durch alimentäre Substitution von Nikotinamid oder Tryptophan läßt sich die Pellagra heilen, und es kommt zu einem Wiederanstieg der während der Krankheit verminderten Nikotinamidserumkonzentration und 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin (Brown et al., 1958; Ellinger et al., 1945; Ellinger & Hardwick, 1947; Goldsmith, 1965, Huff & Perlzweig, 1943; Kochhar, 1948; Löffler et al., 1979a, 1979b; Najjar & Holt, 1941a, 1941b; Sakakida, 1956; Vajic et al., 1956; Vivian et al., 1958). Allerdings ist die 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin von Pellagrapatienten in der Rekonvaleszenzphase unter einer oralen Nikotinamidsubstitutionstherapie im Vergleich zu gesunden Personen zunächst noch vermindert, wahrscheinlich weil das Nikotinamid in einem größeren Umfang als normalerweise üblich vom Organismus retiniert wird, um das Vitaminedefizit zu kompensieren (Ellinger et al., 1945; Ellinger & Hardwick, 1947).

Zu einem Nikotinamidmangelsyndrom kann es auch sekundär durch Malnutrition, intestinale Absorptionsstörungen oder eine gesteigerte Nikotinamidutilisation für die NAD-Biosynthese im Gefolge verschiedener Krankheitszustände wie z.B. beim chronischen Alkoholismus, bei Leberzirrhose, chronischen Durchfallerkrankungen (Enteritis regionalis Crohn, Colitis ulcerosa), langen fieberhaften Infekten, Thyreotoxikose, Diabetes mellitus und bei Krebserkran-

kungen kommen (Goldsmith, 1965). Ein gut dokumentiertes Beispiel dafür ist das Karzinoid: Die von den argentaffinen Zellen des Dünndarms sich ableitenden Tumorzellen konvertieren bis zu 60 % des körpereigenen Tryptophan zum 5-Hydroxytryptamin (Serotonin), so daß weniger Tryptophan zur Biosynthese von NAD zur Verfügung steht, was zu einer Pellagra führen kann (Goldsmith, 1965; Gross & Schölmerich, 1982a). Beim Hartnupsyndrom, einer seltenen hereditären Tryptophantransportstörung, die sowohl die Darmmukosazellen als auch den proximalen Tubulus der Niere betrifft, und daher einerseits zu einer mangelhaften intestinalen Resorption und andererseits zu einer erhöhten Ausscheidung von Tryptophan im Urin führt, kann es zu einer pellagroiden Symptomatik kommen, die durch Nikotinamidgaben gebessert wird (Buddecke, 1978c; Goldsmith, 1965; Gross & Schölmerich, 1982b; Löffler et al., 1979b, 1979f, 1979g).

Zahlreiche Arbeiten weisen darauf hin, daß die Alteration des Nikotinamidstoffwechsels unter ganz unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Bedingungen, insbesondere auch bei Malignomerkrankungen, offensichtlich zu einer Veränderung der Nikotinamidmethylierung und Urinausscheidung von 1-Methylnikotinamid führen kann:

Patienten mit weit fortgeschrittenen Tumorleiden scheiden geringere Mengen 1-Methylnikotinamid im Urin als gesunde Probanden oder Patienten ohne Tumoren aus (Abdel Kader et al., 1962; Basu et al., 1973). Hingegen scheiden Ratten, denen das schnellwachsende Walker 256 Karzinosarkom transplantiert wurde, größere Mengen 1-Methylnikotinamid als gesunde Kontrolltiere aus (Clark et al., 1975a). Ratten, die kurzfristig mit unterschiedlichen alkylierenden Karzinogenen wie z.B. N-Methyl-N-nitrosoharnstoff, Di(2-chlor-ethyl)methylamin, Methylmethansulfonat oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin behandelt wurden, zeigen eine erhöhte Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid im Urin (Chu & Lawley, 1973, 1975; Löfrath & Wennerberg, 1974; Shaikh et al., 1980). Ob dieser Anstieg der 1-Methylnikotinamidausscheidung über eine direkte, nicht enzymatische Methylierung von Nikotinamid durch die alkylierende Substanz oder aber biosynthetisch durch eine enzymatische Nikotinamidmethylierung bewirkt wird, war bisher ungeklärt (Chu & Lawley, 1973; Hoshino et al., 1982a; Johansson-Brittebo & Tjälve, 1979). Ohkubo et al. (1983) zeigten jedoch kürzlich, daß der 24 Stunden nach der Injektion

von alkylierenden Substanzen beobachtete Anstieg der 1-Methylnikotinamidexkretion auf einem Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität beruht, der Folge einer de novo Enzyminduktion ist. In anderen Arbeiten wiederum wurde gezeigt, daß die Behandlung von Ratten mit radiomimetischen Substanzen wie Thiophosphamid oder Sarcolysin in den in vitro inkubierten Leberschnitten zu einer nachhaltigen Inhibition der Nikotinamidmethylierung führt (Savitskii & Zelinski, 1967). Röntgenganzkörperbestrahlung hat bei Ratten ebenfalls eine drastische Hemmung der hepatischen Nikotinamidmethylierung zur Folge (Zelinski, 1966); bei Hunden bewirkt diese Behandlung ein Absinken der 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin (Kalashnikova, 1967). Ratten, die mit dem Hepatokarzinogen Ethionin behandelt wurden, scheiden weniger 1-Methylnikotinamid im Urin aus als die unbehandelten Kontrolltiere. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, daß Ethionin in der Leber zum S-Adenosylethionin transformiert wird, das seinerseits die Nikotinamidmethylase hemmt (Cox, 1981a, 1981b). Ratten, denen über 16 - 30 Wochen das Hepatokarzinogen 2-Acetylaminofluoren verfüttert wurde, zeigen eine sehr ausgeprägte Verschiebung im quantitativen Ausscheidungsmuster der 2- und 4-Pyridone des 1-Methylnikotinamid zugunsten des erstgenannten Pyridonderivates, was auf den während der Hepatokarzinogenese entstehenden Verlust der 1-Methylnikotinamidoxidase II, die für die Oxidation des 1-Methylnikotinamid zum 4-Pyridon verantwortlich ist, zurückgeführt werden konnte (Ohkubo et al., 1977; Ohkubo & Fujimura, 1978). Außerdem wurde kürzlich von Hoshino et al. (1984) gezeigt, daß RLC-Zellen, in der Zellkultur etablierte rasch proliferierende Hepatomzellen (Gerschenson et al., 1970; Oshiro et al., 1972; Schamhart et al., 1979; Studinger, 1979; Volman, 1978), im Gegensatz zur normalen Rattenleber nicht in der Lage sind, 1-Methylnikotinamid zum 2- oder 4-Pyridon zu oxidieren. Die Nikotinamidmethylierungsrate in der Leber von Ratten, denen Rhabdomyosarcome oder M1-Sarkome transplantiert wurden, ist niedriger als in der Leber von gesunden Tieren (Tatarskii, 1955), während in der Leber von Ratten mit dem Walker 256 Karzinosarkom keine Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität festgestellt wurde (Clark et al., 1975a). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, daß die Alterationen der Nikotinamidmethylierung und der Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid während der Karzinogenese sowie bei Patienten bzw. bei Versuchstieren mit Tumoren sehr komplexer Natur sind.

Auch bei bestimmten anderen Krankheiten und unter verschiedenen hormonellen Einflüssen ist die Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid, die beim Menschen einem circadianen Rhythmus mit einem morgendlichen Höhepunkt und einem abendlichen Tiefpunkt der Exkretion (Ellinger & Coulson, 1944) sowie gewissen Veränderungen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht unterliegt (Mairnardi et al., 1962), verändert:

Bei Patienten mit affektiven Psychosen ist die Urinausscheidung von 1-Methylnikotinamid - unabhängig davon, ob sie sich in einer depressiven, manischen oder normothymen Phase befinden - wesentlich niedriger als bei gesunden Probanden (Cazzullo et al., 1976). Auch die gesunden Verwandten ersten Grades von Patienten mit affektiven Psychosen zeigen durchschnittlich eine niedrigere 1-Methylnikotinamidexkretion als gesunde Probanden aus Familien, deren Familienmitglieder keine affektiven Psychosen aufweisen (Cazzullo et al., 1976). Bei Kindern mit mentaler Retardierung unterschiedlicher Genese ist die Exkretion von 1-Methylnikotinamid ebenfalls im allgemeinen niedriger als bei geistig normal entwickelten Kindern (Lis et al., 1966, 1968; 1970). Diesbezügliche Untersuchungen bei schizophrenen Patienten ergaben keine eindeutigen Unterschiede in der Exkretion von 1-Methylnikotinamid im Vergleich zu gesunden Personen (Brown et al., 1960; Mrochek et al., 1976).

Hypophysektomie führt bei Ratten zu einer verringerten 1-Methylnikotinamid-ausscheidung (Gholson, 1968; Greengard et al., 1967). Somatotropinbehandlung bewirkt bei den hypophysektomierten Ratten einen Wiederanstieg der 1-Methylnikotinamidausscheidung (Sanada & Miyazuki, 1980). Während es bei normalen Ratten nach Injektion von Nikotinamid (4 mmol/kg Körpergewicht) oder nach einer Behandlung mit Hydrocortison zu einem Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität um bis zu 100 % kommt, läßt sich bei hypophysektomierten Ratten durch die Injektion von Nikotinamid kein Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität induzieren (Gholson, 1968). Während ovariectomierte Ratten eine deutlich reduzierte 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin zeigen, kommt es im Gegensatz dazu bei weiblichen Ratten nach einer Östrogen- und Progesteronbehandlung zu einem Anstieg, nach einer Testosteronbehandlung hingegen zu einem Abfall der Exkretion von 1-Methylnikotinamid (Lojkin, 1956). Die 1-Methylnikotinamidausscheidung ist während der Schwangerschaft

bei der Ratte und beim Menschen (Brown et al., 1961; Lojkin et al., 1952; Wertz et al., 1958) sowie bei Patienten mit Verbrennungs- oder Verbrühungskrankheiten (Barlow et al., 1977) korrespondierend zu der unter diesen Bedingungen gesteigerten Nikotinamidnutzung für die NAD-Synthese erhöht. Bei Patienten mit einem Diabetes mellitus bleibt die Urinausscheidung des 1-Methylnikotinamids nahezu unverändert, wohingegen die der Pyridonderivate deutlich niedriger ist (Pasquariello, 1964). Ratten mit Diabetes mellitus zeigen eine wesentlich geringere Exkretion von 1-Methylnikotinamid als die gesunden Kontrolltiere (Sanada & Miyazaki, 1980). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Synthese und Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid offensichtlich differenzierten hormonellen Regulationsmechanismen unterliegt.

Ein weiterer Aspekt bei der Diskussion der möglichen Funktionen der Nikotinamidmethylierung ist deren Verbindung zum S-Adenosylmethionin-Stoffwechsel. S-Adenosylmethionin ist nicht nur der Methylendonator für die Nikotinamidmethylierung, sondern auch der Methylgruppendonator für die Methylierung einer Anzahl von anderen physiologischerweise vorkommenden niedermolekularen Verbindungen wie z.B. Guanidinoacetat, Glycin, Noradrenalin oder N-Acetylserotonin (Axelrod & Tomchik, 1958; Im et al., 1979; Kerr, 1972; Löffler et al., 1979h; Lombardini & Tallaly, 1971; van Pilsum et al., 1972; Yanokura et al., 1983; Yanokura & Tsukada, 1982), verschiedenen Arzneimitteln (Forth et al., 1980) und Makromolekülen wie Proteinen, t-RNA und DNA (Borek & Srinivasan, 1966; Cantoni, 1975; Craddock, 1970; Liao et al., 1976; Löffler et al., 1979i; Meselon et al., 1972; Paik & Kim, 1971). Das bei der Synthese von 1-Methylnikotinamid aus Nikotinamid und S-Adenosylmethionin entstehende S-Adenosylhomocystein (Abb. 2, S. 19) ist ein Inhibitor vieler Methyltransferasen (Deguchi & Barchas, 1971; Hoffman et al., 1980; Hoshino et al., 1982a; Kerr, 1972; Swiatek et al., 1973). Es ist bekannt, daß die Methylierung von t-RNA und wahrscheinlich auch von Proteinen und DNA durch eine hohe Nikotinamidmethylierungsrate gehemmt wird (Buch et al., 1972; Gross & Wildenauer, 1972; Halpern et al., 1971; Hoshino et al., 1972a; Oikawa et al., 1980; Swiatek et al., 1973; Utakoji et al., 1979). Es wurde nachgewiesen, daß die Inhibition der t-RNA-Methylierung durch die Nikotinamidmethylierung indirekt durch die Erhöhung der Konzentration von S-Adenosylhomocystein, einem hochpotenten Inhibitor der t-RNA-Methyltransferasen, bewirkt wird (Kerr, 1972; Swiatek et al., 1973). Da die t-RNA-Methylierung für die normale Struktur und Funktion

der t-RNA essentiell ist (Watson, 1977b), könnte die Störung dieses Prozesses durch Depletion des Methylendonators S-Adenosylmethionin bzw. durch die Inhibition der t-RNA-Methyltransferasen durch S-Adenosylhomocystein in der Folge auch zu einer Inhibition der Proteinbiosynthese und des Zellwachstums führen (Bernofsky, 1980). Dieser Mechanismus, der durch die konkurrierende Nikotinamidmethylierung zu einer Hypomethylierung der t-RNA und anderen Makromolekülen mit konsekutiven zellulären Funktionsstörungen führte, wird auch als ein möglicher Wirkungsmechanismus der Toxizität pharmakologischer Nikotinamidkonzentrationen diskutiert (s. dazu auch 1.1., S. 15) (Bernofsky, 1980; Oikawa et al., 1980; Utakoji et al., 1979: In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Nikotinamidmethylierung neben anderen Methylierungsprozessen wie z.B. der Glycinmethylierung eine bedeutende Funktion bei der Regulation der zellulären Konzentration von S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein spielen soll (Kerr, 1972; Swiatek et al., 1973). Allerdings konnte in kultivierten normalen und virustransformierten Rattennierenzellen kein Anhaltspunkt für einen Zusammenhang zwischen der Syntheserate von 1-Methylnikotinamid und einer dazu korrespondierenden Änderung in dem Konzentrationsverhältnis von S-Adenosylmethionin/S-Adenosylhomocystein festgestellt werden (Johnson & Chiang, 1981).

Zur Zeit wird als eine besonders wichtige Funktion der Nikotinamidmethylierung dessen aktive Involvierung in die Regulation der Zellproliferation und DNA-Synthese intensiv diskutiert: Exogen zum Zellkulturmedium gegebenes 1-Methylnikotinamid stimuliert in Konzentrationen von 20 μ M - 5 mM die Proliferation und die DNA-Synthese von kultivierten RLC-Zellen, in der Zellkultur etablierten Rattenhepatomzellen. Diese Proliferationsstimulation durch 1-Methylnikotinamid führt zu einem konkommittierenden Abfall der intrazellulären NAD-Konzentration um 50 %. Außerdem wird der zytotoxische Effekt pharmakologischer Nikotinamidkonzentrationen (0,5 - 5 mM), die die Zellproliferation und DNA-Synthese hemmen, durch 1-Methylnikotinamid antagonisiert (Hoshino et al., 1982b).

In der Rattenleber gibt es eine Korrelation zwischen dem Proliferationszustand der Hepatozyten und der Nikotinamidmethylaseaktivität: Die regenerierende Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie und die Rattenleber, die durch Behandlung mit der mitogen wirkenden Substanz Thioacetamid zur Proliferation angeregt wurde (Morley & Boyer, 1977), haben sowohl eine hohe DNA-

Syntheserate als auch eine hohe cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität, die um ein Mehrfaches höher als in der normalen stationären nicht proliferierenden Kontrolleber sind (Hoshino et al., 1982a). Parallel zu dem Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität in der Leber der thioacetamidbehandelten Ratten sinkt die hepatische NAD-Konzentration wie in den durch die Behandlung mit 1-Methylnikotinamid wachstumsstimulierten RLC-Zellen um 50 % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Außerdem ist es gut dokumentiert, daß die NAD-Konzentration in der regenerierenden Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie wesentlich niedriger als in der stationären Kontrolleber ist (Ferris & Clark, 1971, 1972). Durch einmalige Injektion von D-Galactosamin (375 mg/kg Körpergewicht), einer hepatotoxischen Substanz, die bei Ratten die sogenannte Galactosaminhepatitis induziert (Buddecke, 1980b) und den in Verbindung mit der Leberregeneration nach der partiellen Hepatektomie stattfindenden Anstieg der DNA-Syntheserate inhibiert, wird auch der korrespondierende Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität in der regenerierenden Rattenleber ganz deutlich supprimiert (Hoshino et al., 1982a). Einen sehr ähnlichen Effekt auf die DNA-Syntheserate und die Nikotinamidmethylaseaktivität in der regenerierenden Leber wie D-Galactosamin hat die über drei Tage hinweg wiederholte tägliche Injektion einer pharmakologischen Nikotinamiddosis (2 mmol/kg Körpergewicht) (Hoshino et al., 1982a). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die zelluläre 1-Methylnikotinamidsyntheserate der lebenden Hepatozyten, die gemessen wird, indem Leberschnitte in einem Kulturmedium mit [^{14}C]Nikotinamid in physiologischer (50 μM und 100 μM) oder pharmakologischer Konzentration (1 mM) inkubiert werden und die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid registriert wird, in der regenerierenden oder thioacetamidbehandelten Leber zwei- bis viermal so hoch ist wie in der stationären nicht proliferierenden Kontrolleber (Hoshino et al., 1982a).

Die proliferationsstimulierende Wirkung von 1-Methylnikotinamid in Hepatozyten wird über folgenden biochemischen Mechanismus erklärt: 1-Methylnikotinamid hemmt in Rattenleberschnitten auf eine noch unbekannte Art und Weise als ein wahrscheinlich nichtkompetitiver Nikotinamidantagonist konzentrationsabhängig die NAD-Synthese und führt zu einem Abfall der zellulären NAD-Konzentration und zu einem Anstieg der ATP-Konzentration. Hingegen führt Nikotinamid in Konzentrationen von 1- 20 mM zu einem Anstieg der NAD-Syntheserate und der NAD-Konzentration, der von einem ausgeprägten Abfall der

Konzentration von ATP, das bei der NAD-Synthese verbraucht wird, begleitet wird. Durch zusätzliches 1-Methylnikotinamid im Kulturmedium in einer Konzentration von 10 mM wird sowohl der nikotinamidinduzierte NAD-Konzentrationsanstieg als auch der parallel dazu auftretende Abfall der ATP-Konzentration weitgehend verhindert (Hoshino et al., 1984) (zum biochemischen Wirkungsmechanismus der nikotinamidinduzierten Wachstumsinhibition s. auch 1.1., S. 13). Somit könnte die proliferationsstimulierende Wirkung von 1-Methylnikotinamid in Hepatozyten auf dessen ATP-konservierenden Effekt zurückgeführt werden, der auf einer Inhibition der NAD-Synthese durch 1-Methylnikotinamid beruht. Das durch das 1-Methylnikotinamid vermehrt konservierte ATP und 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat könnten dann zu einer beschleunigten Purin- und Pyrimidinnucleotidsynthese (desoxy-ATP, desocy-GTP und desoxy-TTP) führen und somit die DNA-Synthese und die Zellproliferation fördern (Hoshino et al., 1984).

In einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen von Hoshino et al. (1982a, 1982b, 1984), die die Hypothese einer aktiven Involvierung der Nikotinamidmethylierung und des 1-Methylnikotinamid in die Regulation der hepatozellulären Proliferation stark unterstützen, stehen die Resultate der Arbeitsgruppe von Johnson: Bei kultivierten normalen Rattennierenzellen bewirkt die exogene Applikation von 1-Methylnikotinamid in steigenden Konzentrationen bis zu 7,5 mM, die ja in den kultivierten RLC-Zellen zu einer Stimulation der Proliferation und DNA-Synthese führen (Hoshino et al., 1982b), keine Beeinflussung der Zellproliferation, weder im Sinne einer Stimulation noch im Sinne einer Inhibition (Johnson, 1980a). Außerdem fanden Johnson & Chiang (1981) in verschiedenen normalen und mit Tumorstoffen transformierten Rattennierenzelllinien mit unterschiedlicher Zellpopulationsverdopplungszeit keinen Hinweis für eine Korrelation zwischen der zellulären Syntheserate von 1-Methylnikotinamid und der Proliferationsrate der einzelnen untersuchten Zelllinien; ebensowenig wurde ein Unterschied in der 1-Methylnikotinamid-syntheserate zwischen den normalen und den mit Tumorstoffen transformierten malignen Rattennierenzellen beobachtet (Johnson & Chiang, 1981). Andererseits ist die intrazelluläre 1-Methylnikotinamidkonzentration verschiedener normaler und virustransformierter Rattennierenzelllinien in den logarithmisch proliferierenden Zellen nur etwa halb so hoch wie in den Zellen, deren Wachstum durch Serumdeprivation im Kulturmedium (0,1 % statt 10 % Kälberserum)

vorzeitig inhibiert wurde (Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981). Ferner ist bekannt, daß 1-Methylnikotinsäure (Trigonellin) in bestimmten Pflanzen das Zellwachstum in der G₂-Phase des Zellzyklus arretiert (Evans et al., 1979). 1-Methylnikotinamid ist nicht in der Lage, die Differenzierung (Produktion von Hämoglobin) von kultivierten Erythroleukämiezellen der Maus zu induzieren, obwohl strukturähnliche Verbindungen wie z.B. Nikotinamid, N'-Methylnikotinamid oder Benzamid diese Differenzierung sehr effektiv induzieren (Terada et al., 1979). Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß 1-Methylnikotinamid wahrscheinlich keine Rolle in der zellulären Differenzierung spielt (Johnson & Chiang, 1981; Terada et al., 1979).

Obgleich beim jetzigen Erkenntnisstand der Forschung noch kein endgültiges Urteil über die tatsächliche physiologische Bedeutung der im vorhergehenden dargestellten möglichen Funktionen der Nikotinamidmethylierung abgegeben werden kann, so ist es doch gut dokumentiert, daß Nikotinamid nicht nur in der Leber von Ratte, Hund und Schwein (Cantoni, 1951; Swiatek et al., 1973), sondern auch in den meisten diesbezüglich untersuchten in der Zellkultur etablierten Säugerzelllinien methyliert werden kann: Die Synthese von 1-Methylnikotinamid wurde in aneuploiden menschlichen KB-Nasopharynxkarzinomzellen (Swiatek et al., 1973), embryonalen 3T3 Mausfibroblasten (Jacobson et al., 1979), normalen und tumorvirustransformierten Rattennierenfibroblasten (Johnson, 1980a; 1981; Johnson & Chiang, 1981), in diploiden BHK21/13 Hamsternierenfibroblasten, in Maus L929Zellen, in menschlichen D98/AH2-Zellen (Hillyard et al., 1973; Olivera & Ferro, 1982) und in einigen anderen kultivierten Zelllinien (Bernofsky, 1980; Johnson, 1980b) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde in dem transplantierbaren Walker 256Karzinom eine cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität gemessen, die ungefähr dreimal höher ist als in der normalen Rattenleber (Clark et al., 1975a).

1.4. Motivation und Intention der Arbeit

Im vorhergehenden wurde dargestellt, daß Nikotinamid in einer Reihe von verschiedenen normalen und malignen Zellarten methyliert werden kann. Da jedoch nicht bekannt ist, in welchen Organen des intakten Organismus und vor allem in welchem quantitativen Ausmaß Nikotinamid in den verschiedenen Geweben methyliert wird, wurden normale Organe der Ratte und Maus untersucht, um das Verteilungsmuster der Nikotinamidmethylierung festzustellen.

Da es bisher keine umfassenden Untersuchungen über die Alteration der Nikotinamidmethylierung in Tumorzellen gibt und die Publikationen zu dieser Fragestellung keine eindeutige Beurteilung der Bedeutung und biochemischen Funktion dieses Prozesses in den Tumorzellen ermöglichen, wurde die Nikotinamidmethylierung ferner in einem umfassenden Spektrum von transplantierbaren Rattenhepatomen und non-hepatischen Ascitestumorzellen mit sehr unterschiedlicher Wachstumsrate und Malignität analysiert.

Diese Untersuchungen mit normalen Organen, mit Geweben während der fetalen und postnatalen Entwicklung, mit RLC-Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen und mit Tumoren unterschiedlicher Malignität wurden unternommen, um Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der Nikotinamidmethylierung sowohl in Hinblick auf deren mögliche Regulationsfunktion im zellulären und systemischen Nikotinamidstoffwechsel als auch in Hinblick auf deren Involvement in die Regulation der zellulären Proliferation und DNA-Synthese zu gewinnen.

Ein Zugang zu diesen Fragestellungen wurde mit drei verschiedenen methodischen Ansätzen versucht. Zum einen wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol der normalen Gewebe und Tumoren gemessen. Zum anderen wurden Gewebeschnittkulturen mit den verschiedenen normalen Organen und soliden Hepatomen sowie Zellkulturen mit den Ascitestumorzellen in einem Kulturmedium inkubiert, das eine physiologische [^{14}C]Nikotinamidkonzentration ($36,5 \mu\text{M}$) enthielt, und die Inkorporationsraten von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid wurden gemessen, um Aufschluß über die quantitative Biosynthese von 1-Methylnikotinamid in den lebenden Zellen zu gewinnen. Außerdem wurde die NAD-Konzentration in den verschiedenen Geweben gemessen.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Nikotinamidmethylierung in der normalen erwachsenen Ratte ein Prozess ist, der hauptsächlich auf die Leber beschränkt ist. Es wird demonstriert, daß sowohl die fetale und neonatale Rattenleber als auch die rasch proliferierenden Rattenhepatome und die anaplastischen Ascitestumoren eine stark niedrigere Nikotinamidmethylaseaktivität im Vergleich zur normalen erwachsenen Rattenleber aufweisen. Es wird außerdem gezeigt, daß es sowohl in der normalen Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung als auch in einem Spektrum von trans-

plantierbaren Rattenhepatomen und Ascitestumoren sowie in kultivierten RLC-Zellen eine umgekehrte Korrelation zwischen der zellulären Proliferations- bzw. DNA-Syntheserate und der Nikotinamidmethylaseaktivität gibt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Biologisches Ausgangsmaterial

2.1.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Erwachsene männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 250 - 280 g, erwachsene weibliche Wistar-Ratten (150 - 180 g Körpergewicht), schwangere Wistar-Ratten, erwachsene männliche NMRI-Mäuse (30 - 50 g Körpergewicht), erwachsene weibliche NMRI-Mäuse (20 - 25 g Körpergewicht) und schwangere NMRI-Mäuse wurden von der Zentralen Versuchstierzucht des Bundesgesundheitsamtes in Berlin-Dahlem bezogen.

Virginelle weibliche Wistar-Ratten (200 - 230 g Körpergewicht) wurden bis zur Konzeption gemeinsam mit männlichen Wistar-Ratten (320 - 370 g Körpergewicht) gehalten. Die stattgehabte Konzeption wurde terminiert, sobald keratinisierte Vaginalepithelien und Spermatozoen mikroskopisch im Vaginalabstrich nachgewiesen wurden. Der Tag des Nachweises dieser Phänomene galt als erster Schwangerschaftstag. Ähnlich wurde mit virginellen weiblichen NMRI-Mäusen (25 - 30 g Körpergewicht) verfahren, die bis zum Eintritt der Konzeption zusammen mit männlichen NMRI-Mäusen (35 - 40 g Körpergewicht) gehalten wurden.

Die schwangeren Tiere und die Muttertiere mit ihren Jungen wurden einzeln, alle anderen Tiere wurden in kleinen Gruppen bei 25° C mit einem Tag-Nachzyklus von 12 Stunden gehalten und bekamen Wasser und Altromin Haltdiät (Altromin G.m.b.H., Lage-Lippe) ad libitum.

2.1.2. Transplantation und Gewinnung der Ascitestumorzellen

Die Ehrlich Ascites Tumorzellen wurden auf NMRI-Mäusen gezüchtet. Wöchentlich wurden pro Maus ca. $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen, die in 0,1 ml Ringerlösung (154 mM NaCl; 5,6 mM KCl und 2,3 mM CaCl_2) suspendiert waren, intraperitoneal injiziert. Sieben bis neun Tage nach der Transplantation wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Der tumorzellhaltige Ascites jedes Tumorträgers wurde in Corex 30 Zentrifugenröhrchen gesammelt. Diese wurden mit Ringerlösung aufgefüllt, und die Tumorzellen wurden durch Zentrifugation mit 270 x g (1.500 Umdrehungen/Minute) für 10 Minuten bei 4° C im Rotor SS 34

(Sorvall Inc., Norwalk/CT, U.S.A.) in einer Sorvall Superspeed RC2-B Zentrifuge sedimentiert. Blutig tingierter tumorzellhaltiger Ascites wurde nicht für die Experimente verwendet und verworfen. Nach der Zentrifugation wurde die überstehende Flüssigkeit mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zellsediment anschließend sofort weiterverarbeitet.

Die Sarkom 180 Zellen wurden ebenfalls auf NMRI-Mäuse transplantiert. Wöchentlich wurden pro Maus 0,1 ml Ascitestumorzellsuspension mit ca. 10^7 Zellen intraperitoneal injiziert. Sieben bis neun Tage nach der Transplantation wurden die Sarkom 180 Zellen wie die Ehrlich Ascites Tumorzellen geerntet.

Die Yoshida Ascites Sarkomzellen wurden auf weibliche Wistar-Ratten transplantiert. Alle drei bis vier Tage wurden pro Ratte 0,5 ml Ascites Tumorzellflüssigkeit mit ungefähr $2,5 \times 10^6$ Zellen intraperitoneal injiziert. Vier bis fünf Tage nach der Transplantation wurden die Tumorzellen geerntet.

2.1.3. Gewinnung der Organe von Ratte und Maus

Die Ratten und Mäuse wurden morgens zwischen 9.00 und 10.00 Uhr durch Dekapitation getötet und gründlich entblutet. Die Organe wurden in toto vorsichtig dem Tier entnommen, mit 154 mM NaCl-Lösung (4° C) gewaschen und im Eiswasserbad bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt.

Die schwangeren Ratten wurden entweder am 19. oder am 21. Schwangerschaftstag (Feten drei Tage bzw. einen Tag vor der Geburt) durch Dekapitation getötet. Aus beiden Uterushörnern wurden die Feten herauspräpariert und in 154 mM NaCl-Lösung (4° C) gewaschen. Die Organe von jeweils 8 - 10 Feten einer schwangeren Ratte wurden entnommen, gepoolt und im Eiswasserbad bis zur weiteren Aufarbeitung gekühlt. Die Organe der neugeborenen Ratten wurden, nach Würfen getrennt, ebenfalls gesammelt. Ab einem Alter von 14 Tagen wurden alle biochemischen Analysen mit individuellen weiblichen Tieren durchgeführt. Nach einer Stillzeit von drei Wochen wurden die jungen Ratten von den Muttertieren getrennt und wie die erwachsenen Tiere gehalten (s. 2.1.1., S. 32).

Die schwangeren Mäuse wurden am 18. Schwangerschaftstag (Feten zwei Tage vor der Geburt) durch Dekapitation getötet. Die Organe der fetalen und neonatalen Mäuse eines Wurfes wurden wie oben beschrieben gewonnen und gesammelt. Ab einem Alter von drei Wochen wurden die Untersuchungen mit einzelnen weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Nach der dreiwöchigen Stillzeit wurden die jungen Mäuse von ihren Müttern getrennt und wie die erwachsenen Tiere gehalten.

2.1.4. Blutserumgewinnung

Menschliches Blut wurde von drei jungen gesunden Probanden (♀ 25 Jahre; ♀ 23 Jahre; ♂ 21 Jahre) durch Punktion der Cubitalvene gewonnen. Nach der Gerinnung des Blutes bei Zimmertemperatur wurde das Serum durch Zentrifugation mit 270 x g für 10 Minuten von den zellulären Bestandteilen abgetrennt.

Die Ratten wurden mit Diethylether narkotisiert. Die Halsgefäße wurden durchtrennt und das Blut in Zentrifugenspitzenröhrchen aufgefangen. Die Mäuse wurden ebenfalls mit Diethylether narkotisiert. Das Blut wurde mit Hilfe einer Hämatokritkapillare aus dem Orbitalvenenplexus gewonnen. Das Serum wurde dann wie oben beschrieben von den Blutzellen abgetrennt.

2.1.5. Transplantation und Gewinnung der Rattenhepatome

Männliche ACI-Ratten mit dem Morris minimal deviation Hepatom 9121 (intramuskulär in die Femoralmuskulatur transplantiert) sowie männliche Buffalo-Ratten mit dem Morris Hepatom 7777 (ebenfalls intramuskulär in die Femoralmuskulatur transplantiert) waren ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. W. Reutter und Herrn Priv. Doz. Dr. R. Tauber vom Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin. Die Ratten mit dem Morris Hepatom 9121 wurden 30 Tage, die Tiere mit dem Morris Hepatom 7777 14 Tage nach der Transplantation getötet.

Alle übrigen tumortragenden Ratten wurden bei der Tumorbank des Instituts für experimentelle Pathologie (Direktor: Prof. Dr. K. Goertler) im deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg, gekauft und per Bahnexpress nach Berlin gesandt. Nach der Ankunft wurden die tumortragenden Ratten wie in 2.1.1. (s. S. 32) beschrieben gehalten. Weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit dem Zajdela

Ascites Hepatom (intraperitoneal) wurden vier Tage nach der Transplantation getötet, weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit dem Yoshida Ascites Hepatom AH-130 (intraperitoneal) sechs Tage nach der Transplantation, weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit dem Novikoff Hepatom (subkutan, Rückenhaul) zehn Tage nach der Transplantation, weibliche ACI-Ratten mit dem Morris Hepatom 3924 (subkutan, Rückenhaul) 22 Tage nach der Transplantation, und männliche Buffalo-Ratten mit dem Morris Hepatom 5123 tc (intramuskular, Femoralmuskulatur) wurden 30 Tage nach der Transplantation getötet. Weibliche Buffalo-Ratten mit dem Morris Hepatom 9618A (intramuskulär, Femoralmuskulatur) wurden 160 Tage nach der Transplantation getötet. Zum Zeitpunkt der Gewinnung der soliden Tumoren hatten diese einen maximalen Durchmesser von 2,5 - 4,0 cm erreicht. Die Ascitestumorzellen wurden wie in 2.1.2. (s. S. 32) beschrieben geerntet. Das Gewebe der soliden Hepatome wurde sorgfältig aus dem Tumorbett des Organismus herauspräpariert und gründlich mit 154 mM NaCl-Lösung (40° C) gewaschen. Nichttumöröse bindegewebige oder muskuläre Gewebeanteile wurden exzidiert. Außerdem wurden die Lebern der tumortragenden Tiere entnommen und aufgearbeitet.

2.1.6. Kultur der RLC-Zellen (Rat Liver Cells)

Die RLC-Zellen wurden ursprünglich von Dr. L.E. Gerschenson (University of California, School of Medicine, Los Angeles/CA, U.S.A.) aus der normalen Leber einer erwachsenen Wistar-Ratte isoliert und in der Zellkultur etabliert. Die RLC-Zellen transformierten während der Zellkulturpassagen spontan zu rasch proliferierenden hepatozellulären Karzinomzellen mit multiplen strukturellen und numerischen Chromosomenabberationen (normale Chromosomenzahl in Rattenleberzellen: 42; in RLC-Zellen: 50 - 67) (Oshiro et al., 1972; Studinger, 1979). Der karzinomatöse Charakter der RLC-Zellen wurde in einer Reihe von morphologischen und biochemischen Untersuchungen bestätigt (Gerschenson et al., 1970; Oshiro et al., 1972; Schamhart et al., 1979; Studinger, 1979; Volman, 1978).

In dieser Arbeit wurden Experimente mit klonierten RLC-Zellen durchgeführt: RLC-Zellen wurden in Petrischalen ($\emptyset = 8$ cm) auf 0,45 %-igem Indubiose Weichagar (Industrie biologique française, Clichy) mit 5 % fetalem Kälberserum und den weiter unten genannten Antibiotika bei 37° C in einem Heraeus Brutschrank kultiviert. Mit einer Mikrokapillare wurde unter Lichtmikroskopischer Kon-

trolle eine Zellkolonie dem Agar entnommen. Nach der Zellvereinzellung durch Behandlung der Zellen mit 0,25 %-iger Trypsinlösung (Difco Lab., Detroit/MI, U.S.A.) wurde eine einzelne RLC-Zelle unter den im folgenden beschriebenen Bedingungen angezüchtet und kloniert. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, die Herr Dr. H. Gelderblom (Abteilung Virologie am Robert Koch-Institut) durchführte, wurde festgestellt, daß die RLC-Zellen frei von Mycoplasmakontamination waren.

Die RLC-Zellen wurden als Zellmonolayer in sterilen Costar 3150-Zellkulturplastikflaschen mit einer Kulturfläche von 150 cm² bei 37° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aus 97 % Luft und 3 % CO₂ in einem Heraeus Brutschrank kultiviert. Alle Manipulationen mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar air flow Clean Bench von Gelman Instruments durchgeführt. Als Kulturmedium wurde minimal essential Medium Eagle (MEM) mit Earle's Salzen (Flow Lab., Bonn) und 2 mM L-Glutamin verwendet. Das Medium wurde vor dem Gebrauch durch einen AP15 Vorfilter (Millipore Corporation, Bedford/MA, U.S.A.) und einen Ultipor N66 Membrane Disc Filter (Pall Process Filtration Ltd., Portsmouth, England) sterilfiltriert. Das Kulturmedium enthielt außerdem 0,1 % MEM non essential Amino Acids (Flow Lab.) und 5 % mycoplasmafrees fetales Kälberserum (Gibco Bio-Cult Ltd., Glasgow, England), das für 30 Minuten bei 56° C im Wasserbad inkubiert wurde, um das Komplement zu inaktivieren. Jede Zellkulturflasche enthielt 25 - 30 ml Kulturmedium mit 8,1 µM Nikotinamid und den folgenden Antibiotika: Gentamicin (Flow Lab.) 16,7 µg/ml, Kanamycin (Flow Lab.) 41,7 µg/ml, Ampicillin (Bayer, Leverkusen) 167,0 µg/ml und Tylocine (Anti Pleuro Pneumonia Like Organisms = Anti PPL0, Gibco) 1,0 µg/ml.

RLC-Zellkulturen mit einer Zelldichte von $1,6 \times 10^5$ Zellen/cm² wurden als Stammkulturen für die Experimente benutzt: Zunächst wurden die Zellkulturflaschen mit 15 ml Phosphate Buffered Saline 7 Solution (PBS7; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄ und 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen. Anschließend wurden die RLC-Zellen mit 0,25 %-iger Trypsinlösung bei Zimmertemperatur vom Flaschenboden gelöst. Die Zellen wurden dann mit unterschiedlichen Zelldichten in neue Zellkulturflaschen eingesät und entweder unter den oben beschriebenen oder unter den in 3.4.1. (s. S. 89) angegebenen Bedingungen kultiviert.

Für die Bestimmung der Nikotinamidmethylaseaktivität wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturen mit PBS7 ausgewaschen, und die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen von 10 - 25 Kulturflaschen aus jeder Wachstumsphase wurden gesammelt und durch Zentrifugation mit 270 x g für 10 Minuten bei 4° C sedimentiert. Das Zellsediment wurde dann abgewogen und mit zwei Gewichtsteilen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5; 4° C) aufgenommen und wie in 2.2.1. (s. unten) beschrieben weiterverarbeitet.

2.2. Biochemisch-analytische Methoden

2.2.1. Bestimmung der Nikotinamidmethylaseaktivität

2.2.1.1. Präparation der Gewebeextrakte für den Nikotinamidmethylaseassay

Die Gewebe und Tumorzellen wurden entweder sofort nach der Gewinnung für den Enzymassay aufgearbeitet und die Nikotinamidmethylaseaktivität anschließend gemessen, oder die Gewebe wurden bis zur Aufarbeitung bei -70° C eingefroren. Eigene Untersuchungen mit normaler Rattenleber, RLC-Zellen und mit einigen soliden Hepatomen hatten gezeigt, daß durch das sofortige Einfrieren der Gewebe bei -70° C innerhalb einer Einfrierperiode von mindestens sechs Wochen (ein längerer Zeitraum wurde nicht untersucht) kein Verlust der Nikotinamidmethylaseaktivität entstand. Diese Ergebnisse sind nicht in einer Abbildung oder Tabelle dargestellt.

Die soliden Gewebe und die 270 x g Zellsedimente der Ascitestumorzellen wurden abgewogen und fünf Gewichtsteile Homogenisationspuffer (50 mM Kaliumphosphat; pH 7,5; 4° C) hinzugegeben. Die Skelettmuskulatur (Diaphragma) und Herzmuskulatur der Ratte wurden in kleine Stückchen geschnitten und mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA Werk, Staufen-Breisgau) homogenisiert. Die Suspensionen mit RLC-Zellen, Zajdela Ascites Hepatomzellen sowie Yoshida Ascites Hepatom AH-130 Zellen wurden mit einem Ultraschalldesintegrator (Braun-sonic 300s, Braun-Melsungen) in Duran 50 Zentrifugenspitzzöhrchen (Schott) bei maximaler Intensität unter permanenter Kühlung im Eiswasserbad homogenisiert, indem die Zellsuspension dreimal für 10 Sekunden im Abstand von jeweils zwei Minuten beschallt wurden. Die Vollständigkeit der Homogenisation der Hepatomzellen wurde mikroskopisch mit der Trypanblauvitalfärbung überprüft. Alle anderen Gewebe wurden mit der Schere zerkleinert und vier- bis

sechsmal bei 1.500 Umdrehungen/Minute mit einem Teflonstößel in einem Potter-Elvehjem Homogenisator (Braun-Melsungen), der im Eiswasserbad gekühlt wurde, homogenisiert.

Anschließend wurden die Homogenate mit $12.000 \times g$ (10.000 Umdrehungen/Minute) für 10 Minuten bei $4^{\circ} C$ in Corex15-Zentrifugenröhrchen im Rotor SS34 zentrifugiert. Die Fettschicht, die auf der Oberfläche der zentrifugierten Homogenate aufrahmte, wurde vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Oberstände wurden dann mit $105.000 \times g$ (50.000 Umdrehungen/Minute) für 60 Minuten bei $4^{\circ} C$ im Rotor Ti50 (Beckman Instruments G.m.b.H., München) in einer Beckman L5-65 Ultrazentrifuge zentrifugiert. In dem frisch präparierten klaren Cytosol (high speed supernatant) und in den Gewebhomogenaten wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Durch Zugabe von Homogenisationspuffer wurde in den Cytosolpräparationen eine Konzentration von 6,0 - 12,5 mg Protein/ml (240 - 500 μg Protein/Enzymassay) eingestellt. Die Proteinkonzentration in den zur Enzymaktivitätsbestimmung eingesetzten Gewebhomogenaten wurde auf 15,0 - 30,0 mg Protein/ml (600 - 1.200 μg Protein/Enzymassay) eingestellt.

2.2.1.2. Nikotinamidmethylaseassay

Die Nikotinamidmethylaseaktivität in den frisch hergestellten Cytosolpräparationen und Gewebhomogenaten wurde nach der von Hoshino et al. (1982a) beschriebenen Methode mit einigen Modifikationen bestimmt: Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes zur Enzymaktivitätsbestimmung betrug 80 μl . Zu 40 μl Enzymextrakt (Cytosol oder Homogenat) wurden 40 μl Substratlösung gegeben. Die Konzentration der Enzymsubstrate im fertigen Reaktionsansatz betrug 5 mM Nikotinamid (pH 8,6) und 210 μM S-Adenosyl-[methyl- 3H]methionin mit einer spezifischen Radioaktivität von 11,8 Ci/mol. Außerdem enthielt der Ansatz 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,6) und 2 mM Dithiothreitol. Die kinetischen Charakteristika der Nikotinamidmethylase (K_m -Werte für Nikotinamid und S-Adenosylmethionin; K_i -Werte für S-Adenosylhomocystein und 1-Methylnikotinamid, pH-Optimum, Enzymaktivierung durch Dithiothreitol) sind bereits ausführlich von Clark et al. (1975a), Hoshino et al. (1982a) und Swiatek et al. (1973) beschrieben worden. Der lineare Zeitverlauf der Nikotinamidmethylasereaktion im Lebercytosol unter den in dieser Arbeit angewendeten Reaktionsbedingungen wurde bereits von Hoshino et al. (1982a) dokumentiert. Abb. 10 (s. S. 81)

veranschaulicht, daß die Nikotinamidmethylasereaktion auch im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc und des Novikoff Hepatom unter den hier beschriebenen Reaktionsbedingungen bis zu einer Inkubationsdauer von 30 Minuten linear verläuft.

Jeder Gewebeextrakt wurde dreifach analysiert. Leerwertinkubationen mit Homogenisationspuffer (50 mM Kaliumphosphat; pH 7,5) anstelle von Gewebeextrakt wurden routinemäßig bei jedem Versuch durchgeführt, um die nichtenzymatische Hintergrundmethylierung des Nikotinamids zu messen. Die Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten in Zentrifugenröhrchen (Schott) im Wasserbad bei 37° C unter permanentem Schütteln mit 90 Oszillationen/Minute inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 320 µl absolutem Ethanol beendet. Anschließend wurden 16 µl einer wässrigen Lösung mit 100 mM nichtradioaktivem 1-Methylnikotinamid als authentischer Standard für die Dünnschichtchromatographie zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Nachdem die Reaktionsansätze für eine Stunde im Eiswasserbad gestanden hatten, wurde das denaturierte Protein durch Zentrifugation mit 3.000 x g (5.000 Umdrehungen/Minute) für 10 Minuten im Rotor SS34 sedimentiert. 5 µl des klaren alkoholischen Überstandes wurden auf Zellulose Dünnschichtchromatographieplatten (Polygram cel 300, 20 x 20 cm, Machery-Nagel, Düren) appliziert. Die Platten wurden mit dem von Swiatek et al. (1973) beschriebenen Laufmittel, das 1-Butanol, Essigsäure und Wasser (60 : 15 : 25, v/v/v) enthielt, für 4 1/2 Stunden entwickelt und anschließend getrocknet. Am Ende der Entwicklung war die Front des Laufmittels 13,5 - 14,0 cm von der Startlinie entfernt. Der R_F-Wert von S-Adenosylmethionin betrug 0,16; der R_F-Wert von 1-Methylnikotinamid war 0,48. Die Position des 1-Methylnikotinamid auf dem Chromatogramm wurde durch UV-Absorption des authentischen Standards bei 254 nm sichtbar gemacht. Die Flecken, die der Position des 1-Methylnikotinamid entsprachen, wurden markiert, ausgeschnitten und in Szintillationsgläschen überführt. Das 1-[Methyl-³H]nikotinamid wurde durch einstündige Inkubation bei 50° C im Trockenschrank mit 0,5 ml 90 %-igem Soluene-350 Tissue Solubilizer (Packard Instrument Company Inc., Illinois, U.S.A.) aus der Zellulose extrahiert. Dann wurden 10 ml Zinser quickszint 501 Triton Szintillator (Koch light Lab.) hinzugeführt, und die Radioaktivität wurde in einem betaszint 5000 Szintillationsspektrometer gemessen. Als Radioaktivitätsstandard wurden bekannte Quantitäten S-Adenosyl-[methyl-³H]methionin (2 nCi; 20 nCi; 50 nCi und 100 nCi) auf Zellulose Dünnschichtchromatographieplatten

appliziert und wie alle anderen Proben mit 0,5 ml 90 %-igem Soluene-350 Tissue Solubilizer extrahiert. Dann wurden 10 ml Zinser quickszint 501 Triton Szintillator hinzugegeben und die Radioaktivität gemessen. Die Zähleffektivität

$$\frac{\text{counts per minute}}{\text{desintegrations per minute}} \quad \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \quad \text{betrug } 39 \%$$

Die Leerwertinkubationen mit dem Homogenisationspuffer wurden wie die Hauptinkubationen mit dem Enzymextrakt aufgearbeitet, chromatographisch analysiert und anschließend die Radioaktivität gemessen. Die Nikotinamidmethylaseaktivität wurde berechnet als nmol synthetisiertes 1-Methylnikotinamid/mg Protein/30 Minuten.

2.2.2. Inkorporation von [Carbonyl- ^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen und in Zellkulturen mit Ascitestumorzellen sowie RLC-Zellen

Für die Gewebeschnittkulturexperimente wurden feine Gewebeschnitte mit einer Dicke von 0,2 - 0,5 mm aus frisch gewonnenen und im Eiswasserbad gekühlten Organen oder Hepatomen innerhalb von 5 - 10 Minuten nach der Entnahme aus dem soeben getöteten Tier mit einer kleinen Präparierschere und einer scharfen Rasierklinge (Wilkinson-Sword) hergestellt. Die Inkorporationsexperimente mit den Ascitestumorzellen wurden unter Verwendung der 270 x g Zellsedimente durchgeführt. 100 mg Frischgewicht dieser Zellsedimente enthielten $4,7 \times 10^7$ Ehrlich Ascites Tumorzellen; $5,9 \times 10^7$ Sarkom 180 Zellen; $5,2 \times 10^7$ Yoshida Ascites Sarkomzellen; $4,5 \times 10^7$ Yoshida Ascites Hepatom AH-130 Zellen und $4,9 \times 10^7$ Zajdela Ascites Hepatomzellen.

Die metabolischen Inkorporationsexperimente wurden in leicht modifizierter Form nach der von Hoshino et al. (1982a, 1984) beschriebenen Methode durchgeführt: Exakt 100 mg Gewebeschnitte bzw. 100 mg Ascitestumorzellsediment mit 65,7 - 168,3 mg Protein/g Gewebefrischgewicht (detaillierte Angaben über die Proteinkonzentration in den einzelnen Organen und Tumoren sind in Tab. I aufgelistet, s. S. 47) wurden in einen 25 ml Erlenmeyer-Weithalskolben gegeben, der 3 ml Eagle's basal Medium, 2 mM L-Glutamin und 36,5 μM [Carbonyl- ^{14}C]Nikotinamid mit einer spezifischen Radioaktivität von 44,1 Ci/mol (1,67 $\mu\text{Ci/ml}$ Inkubationsmedium) enthielt. Diese Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium

liegt eindeutig in dem für verschiedene Gewebe, Blutserum und Zellkulturmedien angegebenen physiologischen Konzentrationsbereich von 5 - 100 μM bzw. nmol/g Gewebefrischgewicht (Bernofsky, 1980; Buddecke, 1978b; Clark et al., 1975a; Gerber & Deroo, 1970; Grunicke et al., 1969; Hillyard et al., 1973; Hoshino et al., 1982a; 1984; Jacobson et al., 1979; Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981; Keller et al., 1971; Märki & Greengard, 1966). Die Gewebeschnitt- und Ascitestumorzellkulturen wurden im Wasserbad bei 37° C unter permanentem Schütteln mit 90 Oszillationen/Minute in einer Atmosphäre aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ inkubiert. Mit jeder Gewebeprobe wurden Zweifach- bis Vierfachinkubationen durchgeführt. Nach Beendigung der 90-minütigen Inkubation wurden die Gewebeschnittkulturen in das Eiswasserbad transferiert, und das Medium wurde mit 12 ml Homogenisationspuffer (50 mM Kaliumphosphat; 100 mM nichtradioaktives Nikotinamid; pH 6,0; 4° C) ausgewaschen. Die Kulturen mit den suspendierten Ascitestumorzellen wurden in Corex 15-Zentrifugenröhrchen überführt, 12 ml Homogenisationspuffer wurden hinzugefügt, und die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 270 x g für 10 Minuten bei 4° C sedimentiert. Der Oberstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Zu den derart aufgearbeiteten Gewebeschnitten und Ascitestumorzellen wurden dann 0,4 ml 80 %-iger Ethanol gegeben. Die RLC-Zellen, Yoshida Ascites Hepatomzellen und die Zajdela Hepatomzellen wurden wie in 2.2.1.1. (s. S. 37) beschrieben mit dem Ultraschalldesintegrator homogenisiert, alle übrigen Gewebe und Ascitestumorzellen wurden im Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert. Die Gewebe- und Tumorzellhomogenate wurden für eine Stunde im Eiswasserbad gekühlt; anschließend wurde das durch die Ethanolbehandlung denaturierte Protein durch Zentrifugation mit 12.000 x g für 10 Minuten bei 4° C sedimentiert. Zu 200 μl dieses Zellextraktes wurden 10 μl einer wässrigen authentischen Standardlösung für die dünn-schichtchromatographische Analyse gegeben, die jeweils 100 mM nichtradioaktives Nikotinamid, NAD und 1-Methylnikotinamid enthielt. 10 μl des mit der Standardlösung vermischten klaren alkoholischen Zellextraktes wurden auf Zellulose-Dünn-schichtchromatographieplatten (Polygram cel 300, 20 x 20 cm, Machery-Nagel, Düren) appliziert. Die radioaktiven Substanzen wurden mit dem von Witholt (1971) beschriebenen Laufmittel aus Zitronensäure, Ammoniumchlorid, Ethanol und Wasser voneinander getrennt. Die Entwicklungsdauer der Platten betrug 3 1/2 Stunden. Die Frontlinie des Laufmittels war am Ende der Entwicklung 14,0 - 14,5 cm von der Startlinie entfernt. Die Positionen des Nikotinamid, NAD und 1-Methylnikotinamid auf dem entwickelten

Chromatogramm wurden durch UV-Absorption bei 254 nm identifiziert. Der R_F -Wert von Nikotinamid betrug 0,87, der R_F -Wert von NAD 0,09 und der von 1-Methylnikotinamid 0,60. Die Flecken, die den Positionen dieser drei Substanzen entsprachen, wurden ausgeschnitten. Die Extraktion der radioaktiven Substanzen aus der Zellulose und die Radioaktivitätsmessung erfolgten wie in 2.2.1.2. (s. S. 39) beschrieben.

Als Radioaktivitätsstandard wurden bekannte Quantitäten [Carbonyl- ^{14}C]Nikotinamid (1 nCi; 2,5 nCi; 5 nCi und 50 nCi) auf die Dünnschichtchromatographieplatten appliziert, mit 0,5 ml Soluene-350 Tissue Solubilizer extrahiert, und die Radioaktivität wurde gemessen. Die Zähleffektivität betrug 81 %. Zur Bestimmung der Hintergrundradioaktivität wurden nicht mit radioaktiver Substanz versehene Dünnschichtchromatographieplattenflecken mit Soluene-350 Tissue Solubilizer extrahiert, 10 ml Zinser quickszint 501 Triton Szintillator hinzugegeben und die Radioaktivität gemessen.

Die molaren Fraktionen des [^{14}C]Nikotinamid, des [^{14}C]NAD und des [^{14}C]1-Methylnikotinamid wurden unter der Annahme berechnet, daß die spezifische Radioaktivität des extra- und intrazellulären Nikotinamids sowie des NAD und 1-Methylnikotinamids in den Gewebeschnitten und Tumorzellen identisch sind. Von Hoshino et al. (1984) wurde bereits gezeigt, daß die dafür notwendigen Voraussetzungen in den metabolischen Inkorporationsexperimenten mit Gewebeschnittkulturen erfüllt werden: In Rattenleberschnitten, die mit physiologischen und pharmakologischen [^{14}C]Nikotinamidkonzentrationen (11,2 μM - 10 mM) in Eagle's basal Medium inkubiert werden, erreicht die intrazelluläre Konzentration des radioaktiven [^{14}C]Nikotinamids bereits 15 Minuten nach Inkubationsbeginn ein Plateau und bleibt während der gesamten Inkubationsdauer von 120 Minuten konstant. Ähnliches gilt auch für die RLC-Zellen, die für 6 Stunden mit 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid in minimal essential Medium Eagle inkubiert werden. Die Konzentration des intrazellulären [^{14}C]Nikotinamids bleibt in den RLC-Zellen während der gesamten Inkubationszeit nahezu konstant, währenddessen die Radioaktivitätsinkorporation in das NAD und 1-Methylnikotinamid sowohl in den Rattenleberschnitten als auch in den RLC-Zellen stetig zunimmt (Abb. 15, S. 98) (Hoshino et al., 1984). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid die metabolische Aktivität der Gewebeschnitte und der im Kulturmedium suspendierten RLC-Zellen repräsentiert und nicht auf Veränderungen der intrazellulären Konzentration

des [^{14}C]Nikotinamid zurückzuführen ist, die vielmehr während der Inkubationszeit nahezu unverändert bleibt. Die metabolischen Inkorporationsraten werden ausgedrückt als pmol inkorporierte Substanz (Nikotinamid, NAD und 1-Methylnikotinamid)/mg Protein/90 Minuten.

Die Inkorporationsexperimente mit den RLC-Zellen wurden folgendermaßen durchgeführt: Die Zellkulturen wurden mit PBS7 gründlich gespült, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend bei Zimmertemperatur durch Behandlung mit 0,25 %-iger Trypsinlösung vom Flaschenboden gelöst und in PBS7 resuspendiert. Die Zellen von 10 - 25 Kulturflaschen aus jeder Wachstumsphase wurden gesammelt und durch Zentrifugation mit $270 \times g$ für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert. 100 mg Frischgewicht des Zellsediments ($2,8 \times 10^7$ Zellen) mit 66,7 mg Protein/g Zellfrischgewicht wurden in 3 ml minimal essential Medium Eagle mit Earle's Salzen und 0,1 % MEM non essential Amino Acids, 2 mM L-Glutamin und $36,5 \mu\text{M}$ [Carbonyl- ^{14}C]Nikotinamid ($44,1 \text{ Ci/mol}$) suspendiert. Antibiotika und fetales Kälberserum wurden nicht hinzugefügt. Die Inkubation der Zellen und die Extraktion der radioaktiv markierten Substanzen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.

2.2.3. Biosynthese von NAD aus nichtradioaktivem Nikotinamid in Zellkulturen mit Ascitestumorzellen

100 mg Ascitestumorzellsediment wurden wie in 2.2.2. (s. S. 40) beschrieben abgewogen, in 3 ml Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin suspendiert und für 90 Minuten im Wasserbad bei 37°C in einer Atmosphäre aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt nichtradioaktives Nikotinamid in physiologischen und pharmakologischen Konzentrationen ($40 \mu\text{M}$ - 5 mM). Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellkulturen in Corex 15-Zentrifugenröhrchen überführt, und 12 ml Homogenisationspuffer (50 mM Kaliumphosphat; 100 mM Nikotinamid; pH 6,0; 4°C) wurden hinzugefügt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit $270 \times g$ für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert und wie in 2.2.4. (s. unten) beschrieben für den NAD-Assay weiterverarbeitet.

2.2.4. Bestimmung der NAD-Konzentration in Geweben und in Ascitestumorzellen

Die Organe eines frisch getöteten Tieres wurden ohne zeitlichen Verzug entnommen, im Eiswasserbad gekühlt, abgewogen und mit 4 - 9 Gewichtsanteilen

Homogenisationspuffer (50 mM Kaliumphosphat; 100 mM Nikotinamid; pH 6,0; 40° C) wie in 2.2.1.1. (s. S. 37) beschrieben homogenisiert. Die Bestimmung der NAD-Konzentration in den Ascitestumorzellen erfolgte unter Verwendung der 270 x g Zellsedimente, die abgewogen und mit vier Gewichtsanteilen Homogenisationspuffer suspendiert wurden. Die Gewebe und Ascitestumorzellen wurden sofort nach der Homogenisation für 5 Minuten im Wasserbad bei 95° C inkubiert. Die Proben wurden danach für 15 Minuten im Eiswasserbad abgekühlt. Das durch die Hitzebehandlung denaturierte Protein wurde dann durch Zentrifugation mit 3.000 x g für 10 Minuten sedimentiert. Die Bestimmung der NAD-Konzentration (NAD⁺ und NADH₂) in dem klaren Überstand wurde nach der von Nisselbaum & Green (1969) angegebenen enzymatischen Methode mit Alkoholdehydrogenase durchgeführt. Die Konzentration der Substanzen in dem Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 3 ml) betrug: 65 mM Glycylglycinpuffer (pH 7,4); 100 mM Nikotinamid; 330 mM Ethanol. Der Reaktionsansatz enthielt 0,25 mg 3(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumchlorid; 0,8 mg Phenazinmethosulfat und 3 mg lyophilisierte Alkoholdehydrogenase von der Hefe. Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Testlösung (Standardlösung oder Gewebeextrakt) gestartet. Die Extinktionszunahme wurde bei 556 nm im Spektrophotometer Gilford 240 gemessen. Jede Probe wurde zweifach analysiert. Als Standard dienten eine 10 µM und 20 µM NAD-Lösung in 65 mM Glycylglycinpuffer (pH 7,4). Leerwertinkubationen wurden mit Homogenisationspuffer anstelle von Testlösung durchgeführt. Die NAD-Konzentration in den Geweben wurde berechnet als nmol NAD (NAD⁺ und NADH₂)/mg Protein.

2.2.5. Proteinbestimmung

Als Referenzbasis zum Vergleich der Nikotinamidmethylaseaktivität, der NAD- und 1-Methylnikotinamidsyntheseraten sowie der NAD-Konzentration in den verschiedenen Organen und Tumoren wurde die Proteinkonzentration im Homogenat und im Cytosol gemessen. Die Cytosole und Gewebehomogenate wurden in einer Verdünnungsreihe mit Wasser 1 : 50; 1 : 100 und 1 : 200 verdünnt. Die Proteinbestimmung wurde nach der von Lowry et al. (1951) angegebenen Methode mit dem Folin-Ciocalteus Phenolreagenz durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 546 nm im Eppendorf Photometer gemessen. Als Standard diente eine Rinderse-rumalbuminlösung. Leerwertbestimmungen wurden mit Wasser anstelle von Gewebeextrakt durchgeführt. In Tab. I (s. S. 47) ist die Verteilung der Protein-

konzentration im Homogenat der untersuchten Organe und Tumoren angegeben.

2.2.6. Zellzählung

Die 270 x g Zellsedimente der Ascitestumorzellen und RLC-Zellen wurden in definierten Volumina Ringerlösung (154 mM NaCl; 5,6 mM KCl und 2,3 mM CaCl₂) suspendiert und die Zellen unter dem Mikroskop in der Neubauer Zählkammer ausgezählt (Rick, 1977). Zur Bestimmung des Prozentsatzes der mitotischen Zellen in den RLC-Kulturen wurden die Zellen in den Kulturflaschen an verschiedenen Stellen in jeweils einem Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung unter einem Olympus Phasenkontrastauflichtmikroskop ausgezählt (s. dazu auch die Ausführungen in 3.4.1., S. 89). Zur Bestimmung der Zellzahl in den RLC-Kulturen wurden die Zellen von einzelnen Zellkulturflaschen durch Trypsinbehandlung vom Flaschenboden gelöst, in Ringerlösung suspendiert und durch Zentrifugation mit 270 x g für 10 Minuten sedimentiert. Die Ringerlösung wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zu dem Zellsediment wurden erneut bekannte Volumina Ringerlösung gegeben. Die RLC-Zellen wurden resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.7. Chemikalien

1-Methylnikotinamid, NAD, Dithiothreitol und L-Glutamin wurden von der Firma Sigma Chemie G.m.b.H., München, bezogen.

Das Nikotinamid und absoluter Ethanol (pro analysi) waren Produkte der Firma Merck G.m.b.H., Darmstadt.

S-Adenosylmethionin und die lyophilisierte Alkoholdehydrogenase von der Hefe wurden bei Boehringer G.m.b.H., Mannheim, gekauft.

3(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumchlorid und Phenazinmethosulfat waren Produkte der Firma Serva Feinbiochemica G.m.b.H. & Co., Heidelberg.

Das [Carbonyl-¹⁴C]Nikotinamid (spezifische Radioaktivität 56 Ci/mol) und S-Adenosyl-[methyl-³H]methionin mit einer spezifischen Radioaktivität von 15 Ci/mol wurden von Amersham Buchler G.m.b.H. & Co. KG, Braunschweig bezogen.

Alle anderen Chemikalien für Puffer, Reagenzlösungen und Dünnschichtchromatographielaufmittel waren von der Firma Merck G.m.b.H., Darmstadt. Diese Produkte hatten den Reinheitsgrad pro analysi.

Tab. I: Proteinkonzentration in normalen Organen der Ratte und der Maus sowie in verschiedenen Tumoren

Gewebe	Alter (Tage)	Proteinkonzentration (mg Prot./g Gewebefrischgewicht)	
Ratte:	Leber	- 3 (3)	109,1 ± 5,8
		- 1 (6)	111,8 ± 8,9
		+ 1 (6)	134,4 ± 8,5
		+ 7 (6)	142,6 ± 11,3
		+ 14 (6)	151,1 ± 10,3
		+ 28 (6)	155,6 ± 11,3
	+ 62 (5)	168,3 ± 7,8	
	Niere	- 1 (6)	70,1 ± 9,7
		+ 1 (6)	68,7 ± 7,0
		+ 7 (6)	82,9 ± 6,6
		+ 14 (6)	99,4 ± 9,2
		+ 28 (6)	108,2 ± 4,9
		+ 62 (5)	117,2 ± 7,6
	Gehirn (Großhirn-hemisphären)	- 1 (6)	65,7 ± 6,8
		+ 1 (6)	66,8 ± 1,9
		+ 7 (6)	63,3 ± 2,7
		+ 14 (6)	83,4 ± 5,4
		+ 28 (6)	90,0 ± 7,0
+ 62 (5)		96,6 ± 3,0	
Pancreas	+ 62 (3)	142,0 ± 7,8	
	+ 62 (3)	142,0 ± 8,4	
Morris Hepatom 9618A	(3)	117,9 ± 26,0	
Morris Hepatom 9121	(4)	101,2 ± 13,7	
Morris Hepatom 5123tc	(3)	113,6 ± 27,7	
Morris Hepatom 7777	(4)	111,9 ± 14,9	
Morris Hepatom 3924	(4)	103,0 ± 11,3	
Novikoff Hepatom	(4)	78,1 ± 9,6	
Yoshida Hepatom AH-130	(4)	107,0 ± 7,2*	
Yoshida Sarkom	(4)	113,6 ± 21,5*	
Zajdela Hepatom	(5)	144,9 ± 9,9*	
RLC-Zellen	(3)	66,7 ± 9,2*	
Maus:	Leber	+ 50 (6)	159,8 ± 20,2
	Niere	+ 50 (6)	110,1 ± 14,2
	Gehirn	+ 50 (6)	89,8 ± 13,4
	Ehrlich Ascites Tumor	(6)	86,0 ± 19,3*
	Sarkom 180	(6)	103,7 ± 18,7*

Die Proteinkonzentration im Homogenat verschiedener Organe und Tumoren von Ratte und Maus wurde nach der von Lowry et al. (1951) angegebenen Methode gemessen. Die Daten sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von 3 - 6 einzelnen Geweben. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Gewebe angegeben.

* Die Tumorzellen wurden durch Zentrifugation mit 270 x g für 10 Minuten sedimentiert, und das Tumorzellsediment von jedem einzelnen tumortragenden Tier sowie das Sediment von fünf Zellkulturen mit RLC-Zellen wurde abgewogen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Nikotinamidmethylierung in verschiedenen Organen der erwachsenen Ratte und Maus

3.1.1. Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität in normalen Organen der Ratte und der Maus-----

Im Cytosol verschiedener Organe von erwachsenen Wistar-Ratten wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität gemessen. Tab. II (S. 49) zeigt, daß das Rattenlebercytosol von allen getesteten Organcytosolpräparationen die höchste Nikotinamidmethylaseaktivität hat. Tab. II demonstriert, daß sich die Nikotinamidmethylaseaktivität im Lebercytosol der weiblichen Ratten praktisch nicht von der der männlichen Ratten unterscheidet.

Die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol der Nebenniere beträgt 14 %, die im Cytosol des Pancreas 13 % der Rattenleberaktivität. Die Rattenniere besitzt nur 8 % der Enzymaktivität der Leber. Ein ähnliches Verhältnis von Rattenleberaktivität zu Rattennierenaktivität wurde von Clark et al. (1975) und Hoshino et al. (1982a) gefunden. Rattennierenhomogenat hat eine Nikotinamidmethylaseaktivität, die 15 % derjenigen des Rattenleberhomogenates beträgt (s. Tab. III S. 50).

Die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von Thymus, Milz, Gehirn und Lunge ist noch niedriger als in der Niere und beträgt weniger als 4 % der Rattenleberaktivität. In Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur, Schilddrüse sowie im Blutserum der Ratte wurde ebenfalls eine äußerst niedrige Nikotinamidmethylaseaktivität gemessen.

In Tab. II ist außerdem die Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol verschiedener Organe von erwachsenen NMRI-Mäusen zusammengefaßt.

Der entscheidende Unterschied im Vergleich zu den mit den Rattenorganen erhobenen Befunden ist die Tatsache, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol der Mausleber nur etwa 10 % der Rattenleberaktivität beträgt. Es wurde kein bedeutsamer Unterschied in der Nikotinamidmethylaseaktivität des Lebercytosols zwischen den männlichen und weiblichen Mäusen festgestellt. Die Enzymaktivität im Homogenat der Mausleber beträgt 22 % der Enzymaktivität im Rattenleberhomogenat (Tab. III, S. 50).

Tab. II: Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von normalen Organen der Ratte und der Maus

		Nikotinamidmethylaseaktivität [nmol 1-Methylnikotinamid/mg Prot./30 min.]	
Ratte:	♂ Leber (5)	9,1	± 2,2
	♀ Leber (12)	9,3	± 2,8
	Nebenniere (3) ^a	1,3	± 0,6
	Pancreas (4)	1,2	± 0,6
	Niere (12)	0,7	± 0,2
	Thymus (2)	0,3*	
	Milz (3)	0,3	± 0,1
	Lunge (1)	0,2*	
	Gehirn (12) ^b	0,2	± 0,1
	Herz (3)	< 0,2	
	Skelettmuskulatur (3) ^c	< 0,2	
	Schilddrüse (1)	< 0,1*	
	Serum (3)	< 0,1	
Maus:	♂ Leber (3)	0,8	± 0,4
	♀ Leber (6)	0,9	± 0,6
	Niere (9)	0,8	± 0,3
	Nebenniere (1) ^a	0,7*	
	Lunge (1)	0,3*	
	Gehirn (5) ^b	< 0,2	
	Milz (1)	< 0,05*	
	Thymus (1)	< 0,05*	
	Pancreas (1)	< 0,05*	
	Serum (3)	< 0,05	
Mensch:	Serum (3)	< 0,05	

Im Cytosol verschiedener Organe von Ratte und Maus sowie im Blutserum von Ratte, Maus und Mensch wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (s.S. 37) beschrieben gemessen. Die Daten sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 - 12 einzelnen Cytosolpräparationen oder Seren. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Gewebe angegeben.

* Die Organe von drei Tieren wurden zu einem Pool zusammengefaßt und gemeinsam analysiert.

^a Nebennierenrinde und -mark wurden gemeinsam analysiert.

^b Gewebe aus dem Bereich der beiden Großhirnhemisphären wurde für die Analysen verwendet.

^c Zwerchfelmuskulatur wurde für die Analysen verwendet.

Tab. III: Nikotinamidmethylaseaktivität im Leber- und Nierenhomogenat der erwachsenen Ratte und Maus

		Nikotinamidmethylaseaktivität [nmol 1-Methylnikotinamid/mg Prot./30 min.]	
Ratte:	Leber (6)	2,7	± 1,3
	Niere (6)	0,4	± 0,3
Maus:	Leber (3)	0,6	± 0,3
	Niere (3)	0,3	± 0,1

Im Leber- und Nierenhomogenat von erwachsenen weiblichen Ratten und Mäusen wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (s. S. 37) beschrieben gemessen. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei oder sechs einzelnen Homogenaten. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Gewebe angegeben.

Die Nikotinamidmethylaseaktivität im Mausnieren- und Nebennierencytosol ist nur geringfügig niedriger als in der Mausleber und ist vergleichbar mit derjenigen der Rattenniere und Nebenniere. In der Mausleber beträgt die Enzymaktivität 33 %, im Gehirn weniger als 20 % der Mausleberaktivität. Milz, Thymus und Pancreas der Maus sowie Blutseren von Maus und Mensch (junge gesunde Probanden: ♀ 25 Jahre; ♀ 23 Jahre; ♂ 21 Jahre) haben praktisch keine meßbare Nikotinamidmethylaseaktivität.

3.1.2. Inkorporation von [¹⁴C]Nikotinamid in das [¹⁴C]NAD und [¹⁴C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit normalen Organen der Ratte und der Maus

Um zu überprüfen, ob das Verteilungsmuster der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von normalen Ratten- und Mausorganen die tatsächliche Biosynthese von 1-Methylnikotinamid in den intakten lebenden Zellen reflektiert, wurden frisch präparierte Gewebeschnitte dieser Organe mit einer physiologischen [¹⁴C]Nikotinamidkonzentration (36,5 µM) (Bernofsky, 1980; Buddecke, 1978b;

Clark et al., 1975a; Grunicke et al., 1969; Hillyard et al., 1973; Hoshino et al., 1982a, 1984; Jacobson et al., 1979; Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981; Keller et al., 1971; Märki & Greengard, 1966) unter standardisierten Bedingungen in einem chemisch eindeutig definierten Kulturmedium inkubiert. Es wurde die Aufnahme des [^{14}C]Nikotinamids in die Gewebeschnitte und die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid und [^{14}C]NAD gemessen. In diesem Versuchssystem kann der physiologische Nikotinamidmetabolismus der lebenden Zellen ohne bedeutende Verluste der Stoffwechselaktivität analysiert werden (Ellinger, 1948; Hoshino et al., 1982a; Perlzweig et al., 1943; Williams & Wilson, 1978).

Da die absolute zelluläre Aufnahme des [^{14}C]Nikotinamids in die Gewebeschnitte der verschiedenen Organe variiert (Tab. IV, S. 53), und die absoluten [^{14}C]NAD- und [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsraten außer von der biosynthetischen Kapazität der Zellen natürlich auch von der absoluten [^{14}C]Nikotinamidaufnahme in die Zellen abhängen, wurden zusätzlich die Quotienten der Inkorporationsraten

$$\frac{[^{14}\text{C}]\text{NAD}}{[^{14}\text{C}]\text{Nikotinamid}} = \frac{\text{NAD}}{\text{NAM}} \quad \text{und} \quad \frac{[^{14}\text{C}]1\text{-Methylnikotinamid}}{[^{14}\text{C}]\text{Nikotinamid}} = \frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAM}}$$

gebildet. Diese Quotienten sind ein Maß für die relativen (d.h. auf die Nikotinamidaufnahme bezogenen) Inkorporationsraten von NAD und 1-Methylnikotinamid. Je größer der Wert des Quotienten

$$\frac{\text{NAD}}{\text{NAM}} \quad \text{und} \quad \frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAM}}$$

ist, desto größer sind die relativen Inkorporationsraten von NAD und 1-Methylnikotinamid in den entsprechenden Gewebeschnittkulturen. Vergleicht man die relativen NAD- und 1-Methylnikotinamidinkorporationsraten der Gewebeschnittkulturen verschiedener Organe miteinander, so hat dies den Vorteil, daß dieser Vergleich nicht wie derjenige der absoluten Inkorporationsraten von der von Organ zu Organ variierenden Nikotinamidaufnahme beeinflußt wird. Dadurch wird die quantitative Vergleichbarkeit der NAD- und 1-Methylnikotinamidssynthesekapazität der verschiedenen Gewebe objektiviert.

Tab. IV (S. 53) zeigt, daß die Gewebeschnittkulturen mit den verschiedenen Rattenorganen deutliche Unterschiede in der absoluten [^{14}C]NAD Inkorpora-

tionsrate aufweisen. Die Leber hat die höchste absolute [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate von allen untersuchten Organen, wobei es zwischen der Leber der männlichen und weiblichen Ratten keinen Unterschied gibt. Die NAD-Syntheserate der Niere beträgt 74 %, die des Gehirns 29 % der Inkorporationsrate der Leber. Diese Reihenfolge der NAD-Synthesekapazität in Rattenorganen korrespondiert gut mit den in der Literatur publizierten Ergebnissen (Blake et al., 1967; Blake & Kun, 1971; Gerber & Deroo, 1970). Aus dem Vergleich der Quotienten



geht hervor, daß die relative NAD-Syntheserate der Niere 81 % derjenigen der Leber ausmacht. Die relative NAD-Inkorporationsrate des Gehirns, der Nebenniere und des Pancreas beträgt weniger als 25 % derjenigen der Leber (Tab. IV, S. 53).

In Abb. 3 (S. 54) ist das Dünnschichtchromatographieprofil der Produkte des [^{14}C]Nikotinamids in einer Gewebeschnittkultur mit Rattenleber dargestellt. Dieses zeigt, daß das 1-Methylnikotinamid das wichtigste Produkt des Nikotinamids neben dem NAD in den Rattenleberschnitten ist. Andere Produkte wurden nicht nachgewiesen. Rattenleberschnitte weisen von allen untersuchten Organschnitten die höchste absolute 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate auf, wobei es ebensowenig wie bei der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Leber der männlichen und der weiblichen Ratten gibt. Es fällt auf, daß die 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Leberschnitten von verschiedenen Ratten sehr unterschiedlich ist. Die Variationsbreite der [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Lebern der männlichen Ratten reicht von 11,5 - 22,7 pmol 1-Methylnikotinamid/mg Protein/90 Minuten, in den Lebern der weiblichen Ratten von 9,7 - 53,6 pmol 1-Methylnikotinamid/mg Protein/90 Minuten. Im Gegensatz zu der großen interindividuellen Variabilität zeigen Gewebeschnittkulturen von einer Leber sehr genau übereinstimmende 1-Methylnikotinamidsyntheserate. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Ellinger (1948) und Perlzweig et al. (1943) gemacht. Diese Autoren berichteten außerdem, daß die unterschiedliche 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Leberschnitten verschiedener Ratten sehr gut mit der 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin der Tiere zu Lebzeiten korreliert.

Tab. IV: Zelluläre Aufnahme von [^{14}C]Nikotinamid und metabolische Inkorporation des [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit normalen Organen der erwachsenen Ratte und Maus

		absolute Inkorporationsraten [pmol/mg Protein/90 Minuten]			relative Inkorporationsraten		
		Nikotinamid (NAM)	NAD	1-Methylni- kotinamid (1-MNAM)	NAD NAM	1-MNAM NAM	1-MNAM NAD
Ratte: ♂ Leber ^a	(4)	99,5 ± 16,2	122,7 ± 40,5	16,8 ± 5,4	1,23	0,17	0,14
♀ Leber ^a	(6)	111,1 ± 27,9	130,7 ± 36,2	26,1 ± 18,4	1,18	0,23	0,20
Nebenniere (3)*		173,9 ± 23,2	31,0 ± 4,9	7,0 ± 1,4	0,18	0,04	0,23
Pancreas (3)		198,6 ± 41,6	54,2 ± 4,2	3,5 ± 0,7	0,27	0,02	0,06
Niere ^b (3)		102,4 ± 8,5	97,3 ± 4,7	2,0 ± 0,2	0,95	0,02	0,02
Gehirn ^c (3)		157,4 ± 47,6	37,3 ± 8,3	2,5 ± 0,2	0,24	0,02	0,07
Maus: ♀ Leber ^a	(6)	203,8 ± 28,8	61,9 ± 8,8	7,5 ± 2,5	0,30	0,05	0,12
Niere ^b (3)		271,8 ± 22,7	74,5 ± 16,4	1,5 ± 0,5	0,27	<0,01	0,02
Gehirn ^c (3)		298,4 ± 26,7	37,9 ± 5,6	1,4 ± 0,2	0,13	<0,01	0,04

100 mg Gewebeschnitte verschiedener Organe von Ratte und Maus wurden für 90 Minuten bei 37^o C in 3 ml Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin und 36,5 µM [^{14}C]Nikotinamid in einer Atmosphäre aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ inkubiert. Die radioaktiven Produkte wurden mit der Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 - 6 einzelnen Organen. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Organe angegeben.

* Es wurden drei Poole mit den gesammelten Nebennieren von jeweils fünf Ratten analysiert. Die Nebennierenschnitte wurden aus Rinde und Mark hergestellt.

^a Die Leberschnitte wurden aus dem rechten Leberlappen hergestellt.

^b Die Nierenschnitte wurden aus der Nierenrinde hergestellt.

^c Die Gehirnschnitte wurden aus dem frontalen und parietalen Cortex hergestellt.

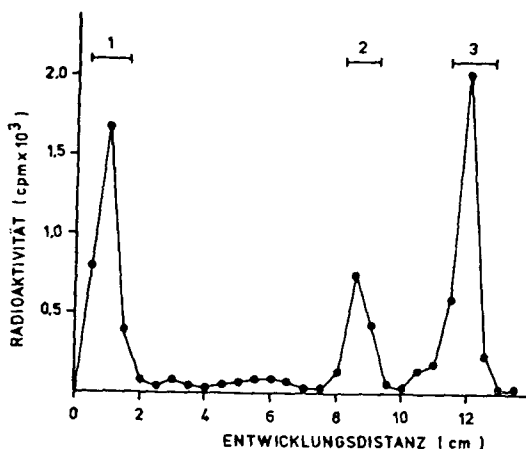


Abb. 3: Dünnschichtchromatographieprofil der Produkte des [¹⁴C]Nikotinamids in Rattenleberschnitten.

100 mg Rattenleberschnitte wurden für 90 Minuten bei 37° C in 3 ml Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin und 36,5 µM [¹⁴C]Nikotinamid (44,1 Ci/mol) inkubiert. 10 µl des alkoholischen Zellextraktes wurden auf Zellulose Dünnschichtchromatographieplatten mit dem von Witholt (1971) beschriebenen Laufmittel aus Zitronensäure, Ammoniumchlorid, Ethanol und Wasser entwickelt. Die Positionen der nichtradioaktiv markierten authentischen Standardsubstanzen, die durch UV-Absorption bei 254 nm identifiziert wurden, sind durch die Balken (1 = NAD; 2 = 1-Methylnikotinamid; 3 = Nikotinamid) gekennzeichnet. Das Chromatogramm wurde in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität gemessen.

Die absolute 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate der Nebennieren- und Pancreasschnittkulturen beträgt 27 % bzw. 13 % derjenigen der Rattenleber. Nieren- und Gehirnschnittkulturen synthetisieren weniger als 10 % 1-Methylnikotinamid im Vergleich zu Leberschnitten. Alle untersuchten non-hepatischen Rattenorgane haben eine relative 1-Methylnikotinamidsyntheserate, die weniger als 20 % derjenigen der Leber ausmacht.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde und wie Abb. 3 nochmals demonstriert, sind 1-Methylnikotinamid und NAD die beiden wichtigsten Produkte des Nikotinamids (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Hoshino et al., 1984; Johnson, 1980; Johnson & Chiang, 1981; Kating & Drephal; 1974; Olivera & Ferro, 1982). Deshalb wurde aus den [^{14}C]1-Methylnikotinamid- und [^{14}C]NAD-Inkorporationsraten der Quotient

$$\frac{[^{14}\text{C}]1\text{-Methylnikotinamid}}{[^{14}\text{C}]\text{NAD}} = \frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAD}}$$

gebildet, um Aufschluß über die quantitative Bedeutung der zellulären 1-Methylnikotinamidsynthese im Vergleich zur NAD-Synthese in den verschiedenen Organen zu gewinnen.

Tab. IV zeigt, daß mit 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium in allen untersuchten Organen die Inkorporationsrate in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid niedriger ist als in das [^{14}C]NAD. Leber- und Nebennierenschnitte haben die höchste auf die [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate bezogene [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate, während die von Pancreas und Gehirn weniger als 35 % derjenigen der Leber beträgt. Die Niere zeigt von allen untersuchten Rattenorganen die niedrigste 1-Methylnikotinamidsyntheserate in Relation zur NAD-Syntheserate.

Es gibt somit keine einheitliche Beziehung zwischen der [^{14}C]NAD- und [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Gewebeschnittkulturen mit verschiedenen Organen. Vielmehr zeigen die Ergebnisse, daß die 1-Methylnikotinamidsyntheserate im Vergleich zur NAD-Syntheserate in allen Organen mit Ausnahme der Leber und Nebenniere relativ niedrig ist.

In den Gewebeschnittkulturen mit Mausorganen ist die zelluläre [^{14}C]Nikotinamidaufnahme höher als in den entsprechenden Rattenorganen (Tab. IV, S. 53).

Die absolute und die relative NAD-Syntheserate in der Mausleber und Mausniere sind ungefähr doppelt so hoch wie im Gehirn. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten von Kaplan et al., (1956).

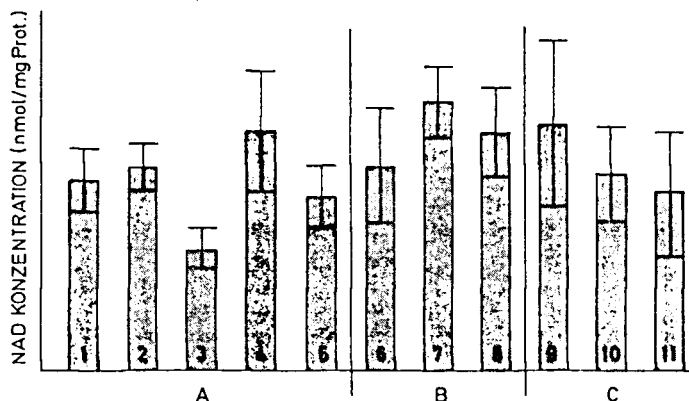
Die absolute und die relative 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Gewebeschnittkulturen mit Mausleber betragen nur 29 % bzw. 22 % derjenigen mit Rattenleber. Mausniere und Mausgehirn synthetisieren [^{14}C]1-Methylnikotinamid mit vergleichbaren Raten wie Rattenniere und Rattengehirn.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß die zelluläre [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in Gewebeschnittkulturen mit verschiedenen Ratten- und Mausorganen, die mit $36,5 \mu\text{M}$ [^{14}C]Nikotinamid ($44,1 \text{ Ci/mol}$) inkubiert wurden, das Verteilungsmuster der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität reflektiert: Rattenleber hat von allen untersuchten Organen die größte Nikotinamidmethylierungskapazität, sowohl im Nikotinamidmethylaseassay als auch in den Gewebeschnittkulturexperimenten (Tab. II, S. 49; Tab. III, S. 50; Tab. IV, S. 53). Ferner zeigen diese Untersuchungen, daß Mausleber und verschiedene non-hepatische Organe von Ratte und Maus Nikotinamid in erheblich geringerem Umfang als Rattenleber methylieren.

3.2.3. Verteilung der NAD-Konzentration in normalen Organen der Ratte und der Maus

Im vorhergehenden wurde gezeigt, daß die Unterschiede in der Nikotinamidmethylierungskapazität von verschiedenen normalen Ratten- und Mausorganen sehr beträchtlich sind (Tab. II - IV). In der Einleitung wurde bereits dargestellt, daß die zelluläre Nikotinamidkonzentration diejenige der zellulären Pyridinucleotide entscheidend mitbestimmt (Bernofsky, 1980; Johnson, 1980a; Hoshino et al., 1984), und daß die Nikotinamidmethylierung für ein wichtiges homeostatisches Regulativ in der Aufrechterhaltung einer optimalen humoralen und zellulären Nikotinamidkonzentration gehalten wird (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Gholsen, 1968). Es wurde daher untersucht, welche Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der zellulären NAD-Konzentration in den einzelnen Organen besteht.

Abb. 4: NAD-Konzentration in normalen Organen der erwachsenen Ratte und Maus und in anaplastischen non-hepatischen Ascitestumorzellen.



Die Tiere wurden getötet und die Organe und Tumorzellen sofort anschließend für den NAD-Assay weiterverarbeitet. Die NAD-Bestimmung wurde nach der Methode von Nisselbaum & Green (1969) durchgeführt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 - 11 einzelnen Organen bzw. den Ascitestumorzellen der tumortragenden Tiere. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Proben angegeben.

A = Ratte: 1 - Leber	(11)	B = Maus: 6 - Leber	(11)
2 - Nebenniere (Rinde und Mark)	(5)	7 - Niere	(11)
3 - Pancreas	(5)	8 - Gehirn (Großhirnhemisphären)	(11)
4 - Gehirn (Großhirnhemisphären)	(11)		

C = Tumoren: 9 - Ehrlich Ascites Tumor	(10)
10 - Sarkom 180	(10)
11 - Yoshida Ascites Sarkom	(4)

In Abb. 4 (S. 57) ist die Verteilung der NAD-Konzentration in verschiedenen Organen von Ratte und Maus sowie in einigen anaplastischen non-hepatischen Ascitestumoren gezeigt. Die Unterschiede in der NAD-Konzentration zwischen den verschiedenen Rattenorganen sind relativ gering. In allen analysierten Rattengeweben liegen die Mittelwerte der NAD-Konzentration in einem Bereich von 3,0 - 4,0 nmol NAD⁺ und NADH₂/mg Protein. Lediglich im Pancreas ist die NAD-Konzentration niedriger (2,0 nmol/mg Protein). Bei der Maus liegen die Mittelwerte der NAD-Konzentration in den verschiedenen Geweben ebenfalls dicht beieinander (3,5 - 4,5 nmol NAD/mg Protein). Sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus weist die Niere die höchste NAD-Konzentration von allen untersuchten Geweben auf. Mausgehirn hat eine höhere NAD-Konzentration als Rattengehirn, wogegen die NAD-Konzentration in den Lebern der beiden Spezies sehr ähnlich ist.

Es konnte keine Beziehung zwischen der NAD-Konzentration in den untersuchten Geweben und der NAD-Inkorporationsrate in den entsprechenden Gewebeschnittkulturexperimenten festgestellt werden. Obwohl beispielsweise das Gehirn sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus in den Gewebeschnittkulturexperimenten eine niedrige [¹⁴C]NAD-Inkorporationsrate zeigt, unterscheidet sich die NAD-Konzentration des Gehirns nicht wesentlich von der der Leber und Niere, die wiederum eine hohe [¹⁴C]NAD-Inkorporationsrate haben (Tab. IV, S. 53, Abb. 4, S. 57).

Außerdem gibt es keine ersichtliche Beziehung zwischen der NAD-Konzentration in den einzelnen Organen und ihrer Kapazität, Nikotinamid zu methylieren. Die NAD-Konzentration in den analysierten Organen unterscheidet sich lediglich maximal um den Faktor 2, während sich die Nikotinamidmethylaseaktivität und die [¹⁴C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Gewebeschnittkulturen dieser Organe bis um den Faktor 50 unterscheiden (Tab. II, S. 49, Tab. III, S. 50, Tab. IV, S. 53, Abb. 4, S. 57). Dabei kontrastiert die hohe Nikotinamidmethylierungskapazität der Rattenleber mit der niedrigen Nikotinamidmethylaseaktivität und [¹⁴C]1-Methylnikotinamidsyntheserate der Mausleber, obwohl die NAD-Konzentration der Rattenleber nicht von der der Mausleber differiert. Analoges gilt auch für den Vergleich von Rattenleber mit Rattenniere oder von Rattenleber mit Rattengehirn.

3.2. Veränderung der Nikotinamidmethylierung während der fetalen und postnatalen Entwicklung

3.2.1. Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung

Abb. 5 (S. 60) illustriert die Veränderung der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn der Ratte während des Entwicklungsabschnittes vom 19. Schwangerschaftstag (Feten drei Tage vor der Geburt) bis zum 62. Lebenstag, an dem die weiblichen Tiere bereits geschlechtsreif sind.

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchung ist die Tatsache, daß die fetale Rattenleber drei Tage vor der Geburt eine Nikotinamidmethylaseaktivität aufweist, die mit $0,2 \pm 0,1$ nmol synthetisiertem 1-Methylnikotinamid/mg Protein/30 Minuten nur ungefähr 2 % der Enzymaktivität der erwachsenen Rattenleber beträgt. Bereits einen Tag vor der Geburt (21. Schwangerschaftstag) steigt die Nikotinamidmethylaseaktivität der fetalen Rattenleber auf einen Wert von $2,6 \pm 0,6$ nmol synthetisiertes 1-Methylnikotinamid/mg Protein/30 Minuten, also 28 % der Enzymaktivität der adulten Leber. Der progrediente Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität setzt sich in der frühen postpartualen Entwicklungsphase der Ratten fort. Wenn die Ratten ein Alter von vier Wochen erreicht haben, ist die hepatische Nikotinamidmethylaseaktivität bereits auf dem Stand der erwachsenen Rattenleber. Ein sehr ähnlich verlaufender Anstieg der Enzymaktivität wie im Cytosol wird auch im Leberhomogenat im Verlaufe der fetalen und postnatalen Rattenentwicklung beobachtet (Tab. V, S. 61). Es kommt also in der Rattenleber während des Entwicklungsabschnittes von drei Tagen vor der Geburt bis zum 28. Lebenstag, währenddessen eine Vielzahl sehr komplexer, parallel wirkender Proliferations- und Zelldifferenzierungsprozesse ablaufen (s. dazu die Ausführungen in 4.3., S. 110, und 4.4., S. 114), zu einem Anstieg der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität um das 47-fache des Ausgangswertes.

Im Gegensatz zur Leber wurde in der Rattenniere während der fetalen und postnatalen Entwicklung nur ein sehr gering ausgeprägter Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität in der Perinatalperiode festgestellt. Dies gilt sowohl für die Enzymaktivität im Cytosol als auch für diejenige in Nierenhomogenat (Abb. 5, S. 60; Tab. V, S. 61). Die Nikotinamidmethylaseaktivität in der Niere ist

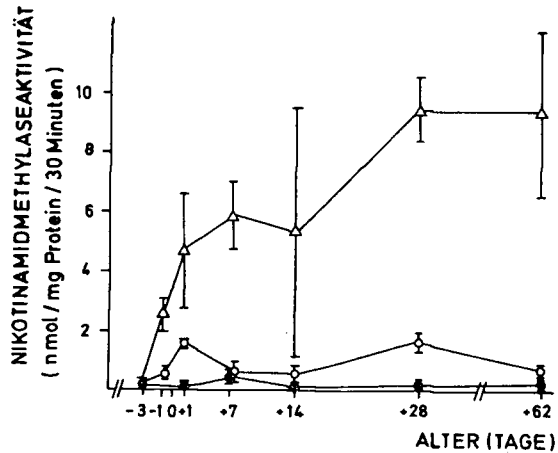


Abb. 5: Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung

Im Cytosol von Leber, Niere und Gehirn von Ratten unterschiedlichen Alters wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (s. S. 37) beschrieben gemessen. Die Organe der fetalen und neonatalen Ratten eines Wurfes bis zu einem Alter von 7 Tagen wurden gesammelt und als Pool analysiert. Die Organe der älteren Tiere wurden einzeln analysiert. Nach einer Stillzeit von drei Wochen wurden die jungen Ratten von den Muttertieren getrennt und wie die erwachsenen Tiere gehalten. Jeder Punkt in den Kurven repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung von je 3 - 12 einzelnen Cytosolpräparationen. Beim Gehirn wurden die Großhirnhemisphären analysiert, (- Δ - Δ -) Leber, (-o-o-) Niere, (- \bullet - \bullet -) Gehirn

Tab. V: Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Homogenat von Rattenleber und Rattenniere während der fetalen und postnatalen Entwicklung.

Alter [Tage]	Nikotinamidmethylaseaktivität [nmol 1-Methylnikotinamid/mg Protein/30 Minuten]
Leber - 1 (3)	0,4 ± 0,2
+ 1 (3)	0,7 ± 0,3
+ 7 (3)	1,1 ± 0,3
+14 (3)	1,4 ± 0,6
+28 (3)	2,3 ± 0,3
+62 (6)	2,7 ± 1,3
Niere - 1 (3)	<0,15
+ 1 (3)	0,3 ± 0,1
+ 7 (3)	0,2 ± 0,1
+14 (3)	0,3 ± 0,05
+28 (3)	0,5 ± 0,1
+62 (6)	0,4 ± 0,3

Im Leber- und Nierenhomogenat von Ratten unterschiedlichen Alters wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (s. S.37) beschrieben gemessen. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert ± Standardabweichung von 3 - 6 einzelnen Organhomogenaten. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Gewebe angegeben.

zu jedem Zeitpunkt des in dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsabschnittes niedriger als in der Leber.

Die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität des Gehirns zeigt praktisch keine Veränderung während des gesamten untersuchten Entwicklungsabschnittes; sie bleibt permanent auf einem annähernd konstant niedrigen Stand (Abb. 5, S. 60).

In Ergänzung zu den in 3.1.1. (S. 48) referierten Befunden zeigen diese Ergebnisse, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in der Niere und im Gehirn auch während der fetalen und postnatalen Entwicklung wesentlich niedriger als in der Leber ist. Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Resultate, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in der Leber der Ratte im Gegensatz zur Ratteniere und zum Rattengehirn während der fetalen und postnatalen Entwicklung deutlich ansteigt.

3.2.2. Veränderung der Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung

In Tab. VI (S. 63) sind die Ergebnisse der metabolischen Inkorporationsexperimente mit Gewebeschnittkulturen der Leber, der Niere und des Gehirns von Ratten unterschiedlichen Alters gezeigt. Abb. 6 (S. 65) illustriert die Veränderung der relativen metabolischen Inkorporationsrate von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen dieser Organe in Abhängigkeit vom Lebensalter der Ratten.

Die absoluten [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheseraten in Leberschnitten von fetalen Ratten am 19. Schwangerschaftstag (Feten drei Tage vor der Geburt) und von fetalen Ratten am 21. Schwangerschaftstag (Feten einen Tag vor der Geburt) betragen nur 13 % und 21 % derjenigen der erwachsenen Rattenleber. Die relativen [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsraten der fetalen Rattenlebern am 19. Schwangerschaftstag (21. Schwangerschaftstag) betragen lediglich 4 % (13 %) derjenigen der adulten Leber. Tab. VI und Abb. 6 zeigen, daß die absolute und die relative 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Leberschnitten während der späten fetalen und frühen postnatalen Entwicklung rasch auf die für die erwachsene Leber typischen Werte ansteigen. Beim Vergleich der

Tab. VI: Veränderung der metabolischen Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung

Alter (Tagel)	absolute Inkorporationsraten [pmol/mg Protein/90 Minuten]			relative Inkorporationsraten		
	Nikotinamid (NAM)	NAD	1-Methylnikotinamid (1-MNAM)	NAD NAM	1-MNAM NAD	
Leber	- 3 (3)	348,1 ± 39,9	50,7 ± 12,5	3,3 ± 0,6	0,15	0,07
	- 1 (3)	162,6 ± 28,6	102,8 ± 29,5	5,4 ± 3,6	0,63	0,05
	+ 1 (3)	94,5 ± 20,8	69,2 ± 22,3	14,9 ± 3,7	0,73	0,22
	+ 7 (3)	74,3 ± 18,2	30,8 ± 11,2	18,9 ± 5,6	0,41	0,61
	+ 28 (3)	133,0 ± 16,7	167,8 ± 28,9	39,2 ± 8,4	1,26	0,23
	+ 62 (6)	111,1 ± 27,9	130,7 ± 36,2	26,1 ± 18,4	1,18	0,20
Niere	- 1 (3)	296,7 ± 25,7	209,7 ± 18,5	28,5 ± 2,9	0,71	0,14
	+ 1 (3)	304,2 ± 30,6	235,8 ± 20,3	27,7 ± 2,9	0,78	0,12
	+ 7 (3)	148,4 ± 14,5	112,2 ± 4,8	4,8 ± 0,8	0,76	0,04
	+ 28 (3)	209,6 ± 18,5	174,5 ± 18,5	3,7 ± 0,4	0,83	0,02
	+ 62 (3)	102,4 ± 8,5	97,3 ± 7,7	2,0 ± 0,2	0,95	0,02
	Gehirn (Großhirn- hemispähren)	- 1 (3)	345,5 ± 47,2	181,1 ± 32,0	4,6 ± 1,1	0,52
+ 1 (3)		218,7 ± 61,8	75,4 ± 13,6	2,2 ± 0,6	0,34	0,03
+ 7 (3)		207,0 ± 31,6	36,2 ± 14,2	2,4 ± 0,6	0,18	0,07
+ 28 (3)		265,6 ± 20,0	53,3 ± 10,0	3,3 ± 0,7	0,20	0,07
+ 62 (3)		157,4 ± 47,6	37,3 ± 8,3	2,5 ± 0,2	0,24	0,07

100 mg Gewebeschnitte von Leber, Niere und Gehirn von Ratten unterschiedlichen Alters wurden wie in 2.2.2. (s. S. 40) beschrieben inkubiert. Bis zu einem Alter von 7 Tagen wurden die Analysen mit den gesammelten Organen der Jungen eines Wurfes durchgeführt.

Die Organe der älteren Tiere wurden einzeln analysiert.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei oder sechs einzelnen Organproben. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Gewebe angegeben.

Quotienten

$$\frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAD}}$$

zeigt es sich, daß die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in Relation zur NAD-Syntheserate in der fetalen Rattenleber drei- bis viermal niedriger als in der erwachsenen Rattenleber ist. Diese Resultate demonstrieren, daß der während der normalen fetalen und postnatalen Rattenentwicklung beobachtete beinahe 50-fache Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität tatsächlich von einer ebenfalls um ein Mehrfaches ansteigenden metabolischen [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporation in den lebenden Hepatocyten (Leberschnitten) mit einer physiologischen [^{14}C]Nikotinamidkonzentration (36,5 μM) im Kulturmedium begleitet wird.

Tab. VI (S. 63) zeigt, daß die absolute [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Gewebeschnittkulturen mit der fetalen und neonatalen Rattenniere ungefähr vierzehnmal höher als in der adulten Rattenniere ist, um dann ab einem Alter von einer Woche auf die für die erwachsene Niere typischen Werte abzusinken. Auch bei der Betrachtung der relativen [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsraten ist erkennbar, daß diese in den Gewebeschnittkulturen mit der fetalen und neonatalen Niere ungefähr fünfmal höher als in der erwachsenen Niere sind (Abb. 6, S. 65). Der Vergleich der Quotienten

$$\frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAD}}$$

zeigt, daß die [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate im Verhältnis zur [^{14}C]NAD-Syntheserate in der fetalen und neonatalen Rattenniere sechs- bis siebenmal so hoch ist wie in der erwachsenen Niere. Diese Befunde, die eine hohe Syntheserate von 1-Methylnikotinamid in den fetalen und neonatalen Rattennierenschnitten mit 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium demonstrieren, stehen in Kontrast zu den Resultaten für die Nikotinamidmethylaseaktivitätsbestimmung, denn die Enzymaktivität der fetalen und neonatalen Rattenniere ist sowohl im Homogenat als auch im Cytosol nicht um ein Mehrfaches höher, sondern sogar etwas niedriger als in der erwachsenen Niere (Abb. 5, S. 60; Tab. V, S. 61). Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung werden in 4.1. (S. 101) diskutiert.

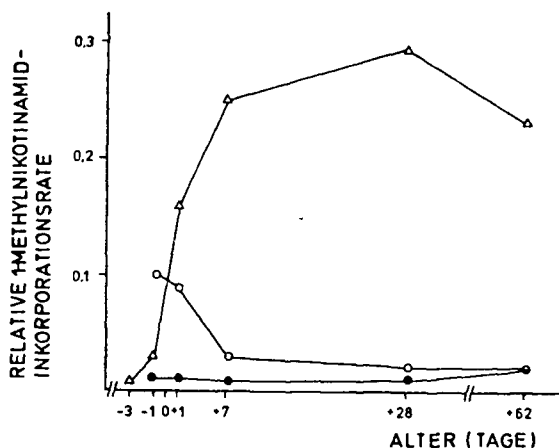


Abb. 6: Veränderung der relativen metabolischen Inkorporation von $[^{14}\text{C}]$ Nikotinamid in das $[^{14}\text{C}]$ 1-Methylnicotinamid $\frac{[^{14}\text{C}]1\text{-Methylnicotinamid}}{[^{14}\text{C}] \text{Nikotinamid}}$ in Gewebeschnittkulturen mit Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung.

100 mg Gewebeschnitte von Leber, Niere und Gehirn, die von Ratten unterschiedlichen Alters gewonnen wurden, wurden wie in 2.2.2 (s. S. 40) beschrieben mit $36,5 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ Nikotinamid im Kulturmedium für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Nikotinamid in die Gewebeschnitte und die zelluläre Syntheserate von $[^{14}\text{C}]$ 1-Methylnicotinamid wurden gemessen (Tab. VI, S. 63) und der Quotient

$$\frac{[^{14}\text{C}]1\text{-Methylnicotinamid}}{[^{14}\text{C}] \text{Nikotinamid}} = \frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAM}}$$

gebildet. Der Wert dieses Quotienten ist ein Maß für die relative Syntheserate von 1-Methylnicotinamid in den Gewebeschnittkulturen (siehe dazu auch 3.1.2.1., S. 50).

(-△-△-) Leber; (-○-○-) Niere; (-●-●-) Gehirn

In den Gewebeschnittkulturrexperimenten mit Rattengehirnen unterschiedlichen Alters wurde keine Veränderung sowohl der absoluten als auch der relativen [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate mit $36,5 \mu\text{M}$ [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium beobachtet (Tab. VI, S. 63; Abb. 6, S. 65). Die Syntheserate von 1-Methylnikotinamid in den Rattengehirnschnitten bleibt während des gesamten untersuchten fetalen und postnatalen Entwicklungsabschnittes auf einem annähernd gleichbleibenden, sehr niedrigen Niveau. Die geringe 1-Methylnikotinamidsynthesekapazität der Rattengehirnschnitte unterschiedlichen Alters, die mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration inkubiert wurden, reflektiert somit die Tatsache, daß sich die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität im Gehirn während der fetalen und postnatalen Entwicklung nicht verändert und sehr niedrig ist (Abb. 5, S. 60).

3.2.3. Veränderung der NAD-Konzentration in Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung

Während der fetalen und postnatalen Entwicklung der Ratte steigt die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität in der Leber fast um das 50-fache des Ausgangswertes an (Abb. 5). In der proliferierenden Rattenleber, die nach der Thioacetamidbehandlung zu einer erhöhten DNA-Synthese- und Zellteilungsrate stimuliert wurde (Morley & Boyer, 1977), wird ein ungefähr dreifacher Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität von einem 50 %-igen Abfall der NAD-Konzentration begleitet (Hoshino et al., 1982a). Eine ganz ähnliche inverse Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der NAD-Konzentration gibt es in der regenerierenden Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie, die ebenfalls eine hohe DNA-Syntheserate aufweist (Ferris & Clark, 1971, 1972; Hoshino et al., 1982a). Es war daher sehr wichtig festzustellen, welche Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der NAD-Konzentration in verschiedenen rasch proliferierenden Organen während der fetalen und postnatalen Entwicklung besteht.

Abb. 7 (S. 67) zeigt, daß die NAD-Konzentration in der fetalen und neonatalen Rattenleber mit einer sehr hohen DNA-Synthese- und Zellteilungsrate (Ferdinandus et al., 1981; Weber, 1977) nur um 16 % niedriger als in der stationären erwachsenen Rattenleber mit einer ganz niedrigen DNA-Synthese- und Zellteilungsrate ist. Die NAD-Konzentration in der Leber steigt innerhalb

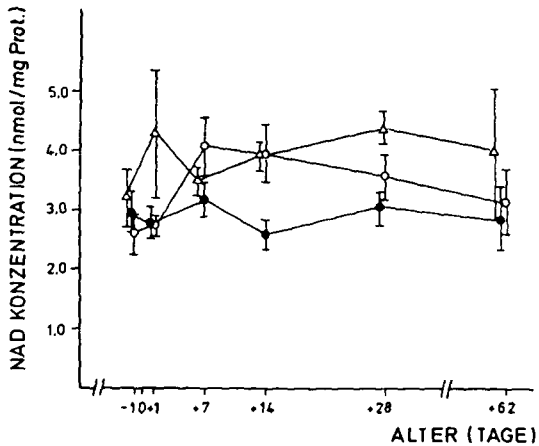


Abb. 7: Veränderung der NAD-Konzentration in Leber, Niere und Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung

Ratten unterschiedlichen Alters wurden getötet und Leber, Niere und Gehirn sofort anschließend für den NAD-Assay weiterverarbeitet. Die Messung der NAD-Konzentration wurde nach der Methode von Nisselbaum & Green (1969) durchgeführt. Bis zu einem Alter von sieben Tagen wurden die Analysen mit den gesammelten Organen der Jungen eines Wurfes durchgeführt.

Die Organe der älteren Tiere wurden einzeln analysiert.

Jeder Punkt in den Kurven repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung von 6 - 11 einzelnen Proben.

Beim Gehirn wurden die Großhirnhemisphären analysiert.

($-\Delta-\Delta-$) Leber; ($-o-o-$) Niere; ($-●-●-$) Gehirn

der ersten Lebenswoche um 56 % an, um dann in der nachfolgenden Entwicklungsphase wieder stetig abzusinken. Ein ähnlicher Verlauf der NAD-Konzentration in der Leber während der fetalen und postnatalen Entwicklung der Ratte wurde von Burch et al. (1964) beschrieben. Ein geringer Anstieg der NAD-Konzentration in der Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklungsperiode wird demnach von einem ungleich stärker ausgeprägten Anstieg der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität und der [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Leberschnittkulturen begleitet (Abb. 5, S. 60; Abb. 6, S. 65; Abb. 7, S. 67; Tab. V, S. 61; Tab. VI, S. 63).

Abb. 7 zeigt, daß die NAD-Konzentration in der fetalen Rattenniere (Feten einen Tag vor der Geburt) um 19 % niedriger als in der erwachsenen Rattenniere ist. Während der frühen postnatalen Entwicklungsphase steigt die NAD-Konzentration in der Niere geringfügig an. Der Verlauf der NAD-Konzentration in der Rattenniere während der fetalen und postnatalen Entwicklung wurde bisher nicht in der Literatur dokumentiert. Ebenso wie die NAD-Konzentration steigt auch die Nikotinamidmethylaseaktivität in der Niere während des untersuchten Entwicklungsabschnittes geringfügig an (Abb. 5, S. 60; Tab. V, S. 61). Im Gegensatz zur Nikotinamidmethylaseaktivität sind in bezug auf die NAD-Konzentration während der fetalen und postnatalen Entwicklung keine deutlichen Unterschiede zwischen Rattenleber und Rattenniere erkennbar (Abb. 5, Abb. 7).

Die NAD-Konzentration im Gehirn verändert sich während des untersuchten Entwicklungsabschnittes vom 21. Schwangerschaftstag (Feten einen Tag vor der Geburt) bis zum 62. Lebenstag kaum; die Mittelwerte der NAD-Konzentration des Gehirns während der fetalen und postnatalen Entwicklung liegen in einem Bereich von 2,6 - 3,1 nmol NAD/mg Protein. Die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität im Gehirn bleibt während der fetalen und postnatalen Entwicklung ebenfalls unverändert (Abb. 5).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die NAD-Konzentration in Leber, Niere und Gehirn während der fetalen und postnatalen Wachstumsperiode nur wenig oder gar nicht ansteigt. Ähnliches gilt für den Verlauf der Nikotinamidmethylaseaktivität in Niere und Gehirn während der Entwicklung. Ganz im Gegensatz dazu steigt die Nikotinamidmethylaseaktivität in der Leber sehr stark an. In den rasch proliferierenden fetalen und neonatalen Rattenorganen gibt es demnach im Gegensatz zur proliferierenden Rattenleber nach der Thioacetamidbehandlung oder nach

der partiellen Hepatektomie keine offensichtliche Korrelation zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der NAD-Konzentration (Ferris & Clark, 1971, 1972; Hoshino et al., 1982a) (Abb. 5, S. 60; Abb. 7, S. 67).

3.2.4. Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn der Maus während der fetalen und postnatalen Entwicklung

Tab. VII (S. 70) zeigt die Veränderung der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität in Leber, Niere und Gehirn der Maus während des Entwicklungsabschnittes vom 18. Schwangerschaftstag (Feten zwei Tage vor der Geburt) bis zum 50. Lebenstag, an dem die weiblichen Tiere bereits geschlechtsreif sind. Das interessanteste Ergebnis dieser Untersuchung ist die Tatsache, daß die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität in der Mausleber während des untersuchten Entwicklungsabschnittes kaum ansteigt, sondern auf einem annähernd konstant niedrigen Stand bleibt. Dieser Verlauf der Enzymaktivität in der Mausleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung steht somit in einem sehr deutlichen Gegensatz zu dem entsprechenden Enzymaktivitätsverlauf in der Rattenleber, in der es während der Zeitspanne vom 19. Schwangerschaftstag (Feten drei Tage vor der Geburt) bis zum 62. Lebenstag ja zu einem fast 50-fachen Anstieg der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität kommt (Abb. 5).

Tab. VII zeigt, daß die fetale Mausniere eine niedrigere Nikotinamidmethylaseaktivität als die Niere der erwachsenen Maus hat. Kurz nach der Geburt steigt die Enzymaktivität in der neonatalen Mausniere leicht an. Dieser Verlauf der Nikotinamidmethylaseaktivität in der Mausniere während der fetalen und postnatalen Entwicklung ähnelt somit demjenigen in der Rattenni-
niere, in der ebenfalls ein relativ geringgradiger Anstieg der Enzymaktivität festgestellt wurde (Abb. 5; Tab. V).

Ebensowenig wie im Rattengehirn wurde im Mausgehirn eine nennenswerte Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität während der Entwicklung registriert (Tab. VII; Abb. 5). Die Enzymaktivität im Gehirn der Maus bleibt während des gesamten untersuchten Entwicklungsabschnittes sehr niedrig.

Tab. VII: Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von Leber, Niere und Gehirn der Maus während der fetalen und postnatalen Entwicklung

	Alter [Tage]	Nikotinamidmethylaseaktivität [nmol 1-Methylnikotinamid/mg Prot./30 Min.]
Leber	- 2 (3)	0,4 ± 0,05
	+ 1 (4)	0,5 ± 0,2
	+ 6 (3)	0,3 ± 0,1
	+21 (3)	0,3 ± 0,05
	+50 (6)	0,9 ± 0,6
Niere	- 2 (3)	0,2 ± 0,1
	+ 1 (4)	1,2 ± 0,2
	+ 6 (3)	0,9 ± 0,3
	+21 (3)	1,3 ± 0,2
	+50 (9)	0,8 ± 0,3
Gehirn (Großhirn- hemisphären)	- 2 (3)	0,3 ± 0,2
	+ 1 (4)	<0,2
	+ 6 (3)	0,3 ± 0,1
	+21 (3)	<0,2
	+50 (5)	<0,2

Im Cytosol von Leber, Niere und Gehirn von Mäusen unterschiedlichen Alters wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (s. S. 37) beschrieben gemessen. Bis zu einem Alter von sechs Tagen wurden die Analysen mit den gesammelten Organen der Jungen eines Wurfes durchgeführt. Die Organe der älteren Tiere wurden jeweils einzeln analysiert. Nach einer Stillzeit von drei Wochen wurden die jungen Mäuse von den Muttertieren getrennt und wie die erwachsenen Tiere gehalten. Die Daten sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 - 9 einzelnen Cytosolpräparationen. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Gewebe angegeben.

3.3. Nikotinamidmethylierung in Tumoren

3.3.1. Nikotinamidmethylierung in anaplastischen non-hepatischen Ascites-tumorzellen und in den Lebern der tumortragenden Tiere-----

Die Ehrlich Ascites Tumorzellen stammen ursprünglich von einem Mammakarzinom der Maus ab, das bereits 1906 von Paul Ehrlich als transplantierbarer Tumor etabliert und in solider Form propagiert wurde. 1932 wurden die Ehrlich Ascites Tumorzellen von Löwenthal & Jahn erstmalig als "Ascites-Krebs" transplantiert. Die Ehrlich Ascites Tumorzellen haben jedoch sämtliche morphologischen Eigenschaften eines epithelialen Tumors verloren und sind vielmehr als anaplastische und rasch proliferierende Tumorzellen mit einer hohen Malignität anzusehen. Die Ehrlich Ascites Tumorzellen wachsen als Einzelzellen in der Peritonealhöhle der Maus, was typisch für undifferenzierte Ascites-tumorzellen ist, die jede Ähnlichkeit mit ihrem epithelialen Muttergewebe verloren haben, während differenzierte epitheliale Ascitestumoren zusammenhängende aus mehreren Zellen bestehende Zellinseln im Ascites bilden (Yoshida, 1971). Die Sarkom 180 Zellen stammen von einem polymorphzelligen Sarkom der Maus ab, das seit 1914 als solider Tumor propagiert wurde und 1952 von Goldie in die Ascitesform überführt wurde. Dieser Tumor ist ebenfalls vollkommen undifferenziert und sehr bösartig. Die Sarkom 180 Zellen wachsen wie die Ehrlich Ascites Tumorzellen als Einzelzellen in der Peritonealhöhle der Maus, bisweilen in hämorrhagischer Form (Yoshida, 1971).

Die Entstehung des Yoshida Sarkom ist ebenfalls genau bekannt: Yoshida verfütterte 1941 für drei Monate das Karzinogen 4'-Amino-2,3'-dimethylazobenzol an Ratten und bepinselte anschließend deren Rückenhaut mit KAs_2O_3 -Lösung. Bei einem der Versuchstiere entwickelte sich nach vierwöchiger Pinselung ein weißer tumorzellhaltiger Ascites. Histologische Untersuchungen ergaben, daß sich diese Tumorzellen, die multiple strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen aufweisen, wahrscheinlich vom reticulohistiozytären System ableiten, obwohl auch diskutiert wird, daß es sich beim Yoshida Sarkom um ein besonders undifferenziertes Ascites Hepatom handeln könnte, dessen epitheliale Eigenschaften bei der routinemäßigen Transplantation maskiert sind. Die epithelialen Eigenschaften des Yoshida Sarkoms (Tumorzellinselbildung in der Ascites-Flüssigkeit) können durch gleichzeitige Injektion von bestimmten Mausleukämiezellen in die Tumorträger zum Vorschein gebracht werden. Ohne

diese Behandlung mit Leukämiezellen wächst das Yoshida Sarkom, wie es auch in den Experimenten für diese Arbeit verwendet wurde, intraperitoneal in Einzelzellform ohne erkennbare Zellinselbildung. Das Yoshida Sarkom ist wie die beiden anderen vorgestellten Ascitestumoren ein ganz ausgesprochen bösartiger Tumor (Yoshida, 1971).

Im Cytosol der sehr schnell proliferierenden und anaplastischen non-hepatischen Yoshida Ascites Sarkomzellen, Ehrlich Ascites Tumorzellen und Sarkom 180 Zellen wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität gemessen. Aus Tab. VIII (S. 80) geht hervor, daß diese anaplastischen Tumorzellen praktisch keine meßbare Nikotinamidmethylaseaktivität haben.

Zusätzlich wurden frisch von den tumortragenden Tieren gewonnene Tumorzellen in Eagle's basal Medium mit $36,5 \mu\text{M}$ [^{14}C]Nikotinamid ($44,1 \text{ Ci/mol}$) unter aeroben Bedingungen inkubiert, um den Stoffwechsel des [^{14}C]Nikotinamids in den lebenden Tumorzellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration zu studieren. Tab. IX (S. 86) zeigt, daß Yoshida Ascites Sarkomzellen, Ehrlich Ascites Tumorzellen und Sarkom 180 Zellen [^{14}C]Nikotinamid intrazellulär aufnehmen, aber fast überhaupt kein [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid inkorporieren. Allerdings haben diese drei sehr bösartigen Ascitestumorzelllinien eine auffallend hohe absolute und relative [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate. Abb. 8 (S. 73) zeigt das Dünnschichtchromatographieprofil der Produkte des [^{14}C]Nikotinamids in Yoshida Ascites Sarkomzellen. Daraus geht hervor, daß in diesen Tumorzellen außer dem [^{14}C]NAD keine anderen radioaktiven Produkte in bedeutender Quantität nachweisbar sind.

Die Messung der Nikotinamidmethylaseaktivität und der [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporation in Yoshida Ascites Sarkomzellen, Ehrlich Ascites Tumorzellen und Sarkom 180 Zellen zeigte also, daß diese Zellen praktisch nicht in der Lage sind, Nikotinamid zu methylieren.

In Ergänzung zur Bestimmung der Enzymaktivität in den Tumorzellen wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität in den Lebern der tumortragenden Tiere gemessen. Keine der entnommenen Lebern der Ascitestumorträger zeigte bei der sorgfältig durchgeführten makroskopischen Inspektion Metastasen oder Nekrosen. Tab. VIII zeigt, daß sich die hepatische Nikotinamidmethylaseaktivität der Ratten mit dem Yoshida Ascites Sarkom und der Mäuse mit dem Ehrlich Ascites Tumor bzw. dem Sarkom 180 nicht von der hepatischen Enzymaktivität der gesun-

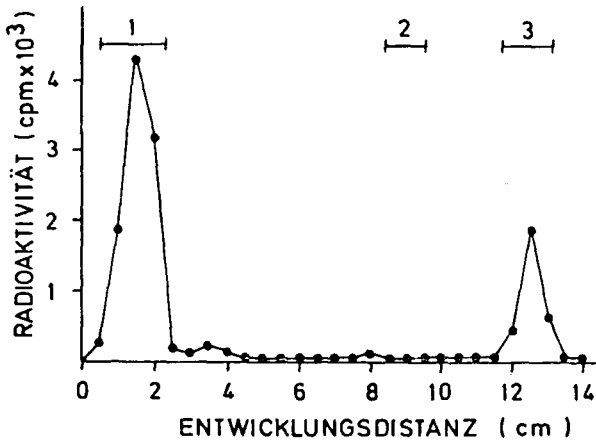


Abb. 8: Dünnschichtchromatographieprofil der Produkte des [¹⁴C]Nikotinamids in Yoshida Ascites Sarkomzellen

100 mg Yoshida Ascites Sarkomzellsediment (10 Minuten mit 270 x g zentrifugiert) mit $5,2 \times 10^7$ Zellen wurden für 90 Minuten bei 37° C in 3 ml Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin und 36,5 µM [¹⁴C]Nikotinamid (44,1 Ci/mol) inkubiert. 10 µl des alkoholischen Zellextraktes wurden auf Zellose Dünnschichtchromatographieplatten mit dem von Witholt (1971) beschriebenen Laufmittel aus Zitronensäure, Ammoniumchlorid, Ethanol und Wasser entwickelt. Die Positionen der nicht radioaktiv markierten authentischen Standardsubstanzen, die durch UV-Absorption bei 254 nm identifiziert wurden, sind durch die Balken angegeben (1 = NAD; 2 = 1-Methylnicotinamid; 3 = Nicotinamid). Das Chromatogramm wurde in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität gemessen.

den Kontrolltiere unterscheidet.

3.3.2. Biosynthese von NAD aus nichtradioaktivem Nikotinamid in Zellkulturen mit anaplastischen non-hepatischen Ascitestumorzellen

Bei den Inkorporationsexperimenten mit den Yoshida Ascites Sarkomzellen, Sarkom 180 Zellen und Ehrlich Ascites Tumorzellen fiel auf, daß die [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheseraten mit $36,5 \mu\text{M}$ [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium sehr niedrig, die [^{14}C]NAD-Syntheseraten hingegen sehr hoch sind (Tab. IX, S. 86). Abb. 4 (S. 57) zeigt, daß sich die zellulären NAD-Konzentrationen in den Ehrlich Ascites Tumorzellen, Sarkom 180 Zellen sowie Yoshida Ascites Sarkomzellen kaum von der in normalen Geweben unterscheiden. Die Mittelwerte der NAD-Konzentrationen in diesen neoplastischen Zellen liegen wie in den normalen Geweben in einem Bereich von $3,0 - 4,0 \text{ nmol NAD/mg Protein}$.

Um die NAD-Synthesekapazität in diesen Tumorzellen zu messen, wurde untersucht, inwieweit es in Abhängigkeit von einer steigenden Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium zu einem Anstieg der intrazellulären NAD-Konzentration als Ausdruck einer de novo NAD-Synthese in den Tumorzellen kommt (Bernofsky, 1980; Blake et al., 1967; Blake & Kun, 1971; Hoshino et al., 1984; Kaplan et al., 1956). Zu diesem Zweck wurden die frisch gewonnenen Ascitestumorzellen in Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin und physiologischen Nikotinamidkonzentrationen ($40 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$) sowie pharmakologischen Nikotinamidkonzentrationen ($0,5 \text{ mM}$; 1 mM und 5 mM) für 90 Minuten bei 37° C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die NAD-Konzentration in den Tumorzellen gemessen.

Abb. 9 (S. 75) zeigt, daß es weder in den Ehrlich Ascites Tumorzellen noch in den Sarkom 180 Zellen mit zunehmender Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium zu einem Anstieg der NAD-Konzentration kommt. In den Yoshida Sarkomzellen steigt die NAD-Konzentration mit 5 mM Nikotinamid im Kulturmedium um 43% gegenüber den mit $40 \mu\text{M}$ Nikotinamid inkubierten Zellen an. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen werden in 4.5. (S. 118) diskutiert.

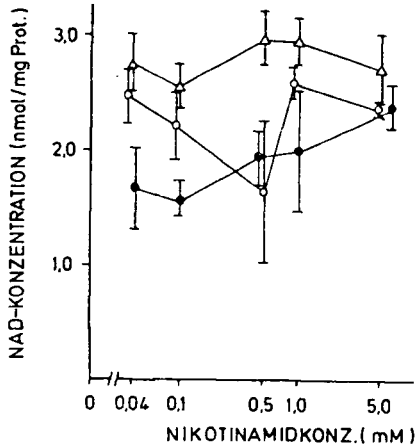


Abb. 9: Biosynthese von NAD in Ehrlich Ascites Tumorzellen, Sarkom 180 Zellen und in Yoshida Ascites Sarkomzellen: Effekt der Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium auf die intrazelluläre NAD-Konzentration in diesen anaplastischen Ascites-Tumorzellen

Die Ascites-Tumorzellen von je drei tumortragenden Tieren wurden gesammelt und durch Zentrifugation mit $270 \times g$ für 10 Minuten sedimentiert. 100 mg der sedimentierten Tumorzellen wurden bei $37^{\circ} C$ in 3 ml Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin und verschiedenen Nikotinamidkonzentrationen für 90 Minuten in einer Atmosphäre aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 inkubiert. Sofort nach der Inkubation wurden die Proben für den NAD-Assay weiterverarbeitet. Die NAD-Konzentration in den Tumorzellen wurde nach der von Nisselbaum & Green (1969) angegebenen Methode bestimmt. Die Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von je drei Inkubationen.

(Δ - Δ -) Ehrlich Ascites-Tumorzellen; (-o-o-) Sarkom 180 Zellen;
 (-●-●-) Yoshida-Sarkomzellen

3.3.3. Nikotinamidmethylierung in Rattenhepatomen

3.3.3.1. Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität in Rattenhepatomen mit unterschiedlicher Wachstumsrate und in den Lebern der tumortragenden Ratten

Da die Leber der gesunden erwachsenen Ratte die höchste Nikotinamidmethylaseaktivität von allen untersuchten Organen hat (Tab. II, S. 49; Tab. III, S. 50; Tab. IV; S. 53), erschienen die verschiedenen transplantierbaren Rattenhepatome als besonders gut geeignete Modelle, um die Veränderungen der Nikotinamidmethylierung in malignen Tumoren zu studieren. Es wurde daher für diese Untersuchungen ein breites Spektrum von Rattenhepatomen mit ganz unterschiedlichen biologischen Charakteristika in bezug auf Malignität, histologischen Differenzierungsgrad und Wachstumsrate ausgesucht:

Von den ungefähr 50 verschiedenen durch chemische Karzinogene induzierten transplantierbaren Morris Hepatomen, die sich alle von der Parenchymzelle der Leber, dem Hepatocyten, ableiten, wurden fünf repräsentative Tumorzelllinien mit im weiten Maße differierenden biologischen Eigenschaften ausgewählt, die in Tab. VIII (S.80) stichwortartig zusammengefaßt sind. Das sehr langsam wachsende Morris minimal deviation Hepatom 9618A wurde durch Verfütterung von 2-(4'-Methyl)benzoylaminofluoren induziert, die Morris Hepatome 9121 und 3924 durch Ingestion von N-2-Fluorenyldiacetamid und die Morris Hepatome 5123tc und 7777 durch Verfütterung von N-2-Fluorenylphthalein.

Obwohl alle Morris Hepatome infiltrierend wachsen und metastasieren, gibt es große Unterschiede zwischen den verschiedenen Hepatomen, die den histologischen Differenzierungsgrad, die architektonische Gewebekonfiguration, die Wachstumsrate und das Metastasierungsverhalten betreffen:

Die hochdifferenzierten Morris "minimal deviation" Hepatome proliferieren ausgesprochen langsam (durchschnittliche Zeit zwischen den Tumortransplantationen 3 - 15 Monate). Die gut differenzierten Morris Hepatome proliferieren etwas rascher (durchschnittliche Zeit zwischen den Tumortransplantationen 2 - 6 Monate), und die niedrig differenzierten Morris Hepatome haben Transplantationsintervalle von unter einem Monat.

Die hochdifferenzierten Morris Hepatome haben den normalen Chromosomensatz der Rattenleberzellen, die gut differenzierten Hepatome zeigen einige und

die niedrig differenzierten Morris Hepatome zeigen deutliche Abweichungen vom normalen Karyogramm der Rattenhepatocyten.

Die hoch und gut differenzierten Morris Hepatome ähneln der normalen Leber in Farbe und Konsistenz. Die Hepatomzellen sind groß und haben ein eosinophiles Cytoplasma. Glykogenspeicherung kann in diesen Hepatomen nachgewiesen werden. Diese Morris minimal deviation Hepatome zeigen typische trabekuläre Lebergewebsstrukturen, die 2 - 3 Zelllagen dick sind. Die Gewebekonfiguration hat eine deutliche Ähnlichkeit mit normalen Leberlappen. Man sieht mikroskopisch außerdem sinusartige Blutgefäße, die von Zellen gesäumt werden, die den Kupffer'schen Sternzellen gleichen. Ferner findet man biläre Canaliculi, die bisweilen mit Gallepigment angefüllt sind.

Die niedrig differenzierten Morris Hepatome sind von fester Konsistenz und haben eine weiße oder graue Farbe. Die Zellen sind i.a. klein, wobei in wechselndem Maße Zellatypien (Pleomorphismus, multinukleäre Zellen) beobachtet werden können. Die Gewebestruktur ist ungeordnet. Die Anordnung der Hepatomzellen hat nur wenig Gemeinsamkeit mit der normalen trabekulären Lebergewebestruktur. Man erkennt viele mitotische Zellen; ein biläres System wird von diesen Tumoren nicht gebildet (Morris, 1965; Morris & Chris, 1977a, 1977b; Morris & Slaughter, 1979; Morris & Wagner, 1968; Novell et al., 1967; Weinhouse, 1972).

Auch in biochemischer Hinsicht sind insbesondere die hoch und gut differenzierten Morris Hepatome der normalen Leber ähnlich. Sie haben im Gegensatz zu sehr undifferenzierten Hepatomen die Fähigkeit zur Harnstoffsynthese (Lawson et al., 1977), Albuminsynthese (Morris & Chris, 1977c), Fettsäureoxidation und Ketonkörperbildung (Weinhouse, 1972). Das Isoenzymmuster der langsam proliferierenden Morris Hepatome gleicht dem der normalen Leber; mit zunehmender Wachstumsrate und zunehmendem Entdifferenzierungsgrad der Morris Hepatome kommt es zu einem progredienten Verlust der leberspezifischen Isoenzyme und zu einem kompensatorischen Auftreten non-hepatischer Isoenzyme (Morris & Chris, 1977d; Weinhouse, 1972).

Otto Warburg bemerkte bereits im Jahre 1924, daß Gewebeschnitte von Tumoren (z.B. Flexner-Joblingsches Rattenkarzinom, verschiedene menschliche Karzinome, Sarkome und benigne Tumoren) in einem glucosehaltigen Kulturmedium im Gegensatz zu Gewebeschnitten normaler Organe auch in Anwesenheit von Sauer-

stoff eine hohe aerobe Glycolyserate (Lactatbildung) aufweisen. Die Hemmung des Glucoseabbaus zu Lactat in normalen Geweben unter aeroben Bedingungen nannte er den Pasteur-Effekt. Er postulierte, daß das Fehlen des Pasteur-Effektes in den Tumorzellen die Konsequenz eines Defektes in der Atmungskette sei und Krebs entstehe, wenn die Zelle auf die irreversible Schädigung ihrer Atmung mit der Adaptation an die aerobe Glykolyse zu Lactat reagiere. Diese Zellen könnten dann ihren differenzierten Zustand nicht mehr aufrechterhalten, würden entarten und autonom proliferieren (Löffler et al., 1979j; Warburg, 1956a, 1956b; Weinhouse, 1972). Erst die Etablierung der langsam proliferierenden Morris minimal deviation Hepatome stellte die grundlegende Bedeutung der aeroben Glykolyse für das maligne Wachstum ernsthaft in Frage, denn diese hoch bis gut differenzierten Hepatome wachsen autonom, metastasieren, führen zum Tod des Tumorträgers, und dennoch zeigen sie eine nur sehr niedrige aerobe Glycolyserate (Weinhouse, 1972). Allerdings zeigte sich, daß die aerobe Glycolyserate graduell von den hoch differenzierten Morris minimal deviation Hepatomen zu den rascher proliferierenden und undifferenzierten Hepatomen zunimmt (Burk et al., 1967; Weinhouse, 1972). Anhand dieser klassischen Untersuchungen mit den differenzierten Morris Hepatomen, die zeigten, daß die hohe aerobe Glycolyserate keine *conditio sine qua non* tumorösen Wachstums ist, wurde eindrücklich demonstriert, welche Bedeutung das große Spektrum der Morris Hepatome mit abgestuften Malignitätsgraden neben den undifferenzierten Rattenhepatomen für die Erforschung der Biochemie der Tumorzellen hat.

Im Gegensatz zu den Morris Hepatomen haben die sehr undifferenzierten transplantierbaren Hepatome wie z.B. das Novikoff Hepatom, das Yoshida Ascites Hepatom AH-130 und das Zajdela Ascites Hepatom kaum noch eine Ähnlichkeit mit dem normalen Lebergewebe: Das Novikoff Hepatom wurde 1957 von A.B. Novikoff durch Verfütterung von 4-Dimethylaminobenzol ("Buttergelb") an Ratten induziert. Bei diesem rasch proliferierenden Tumor findet man alle histologischen Zeichen hoher Malignität, wie z.B. Hyperchromasie, Polymorphie, eine zugunsten des Kerns verschobene Kern-Plasma-Relation und ein stark zur Generalisierung neigendes Metastasierungsverhalten (Löhrke & Hesse, 1981; Novikoff, 1957).

Das Yoshida Ascites Hepatom AH-130 wurde 1951 durch Ingestion von 4-Dimethylaminobenzol und 3'-Methyl-4-aminobenzol als ein solides Rattenhepatom induziert und anschließend in die Ascitesform überführt. Die Yoshida Ascites

Hepatom AH-130 Zellen wachsen in der Peritonealhöhle überwiegend als frei fluktuierende Einzelzellen, bilden jedoch in einem allerdings nicht sehr grossen Prozentsatz als Zeichen ihrer epithelialen Herkunft sog. Hepatomzellinseln, aus mehreren Hepatomzellen aggregierte Tumorzellhaufen. Wie das Yoshida Sarkom zeigt auch das Yoshida Ascites Hepatom AH-130 multiple Chromosomenabberationen (Yoshida, 1957, 1971).

Das Zajdela Hepatom wurde 1963 wie das Novikoff Hepatom durch Verfütterung von 4-Dimethylaminobenzol induziert und wächst intraperitoneal in einer hämorrhagischen Ascitesflüssigkeit. Als Hinweis auf ihren epithelialen Ursprung bilden die Zajdela Ascites Hepatomzellen im Ascites Tumorzellinseln, die eine nur ganz entfernte Ähnlichkeit mit normalem Lebergewebe haben. An dem hohen Malignitätsgrad des Zajdela Ascites Hepatom besteht kein Zweifel. Man findet polymorphe Tumorzellen, mehrkernige Riesenzellen, denen kleine Zellen kappenartig aufsitzen, pathologische Mitosen in grosser Anzahl und wie bei allen undifferenzierten Ascitestumoren eine Aneuploidie. Während der normale Hepatocyt der Ratte einen diploiden Chromosomensatz mit 42 Chromosomen aufweist, schwankt die Chromosomenzahl in dem Zajdela Ascites Hepatom von 35 - 80 Chromosomen/Zellkern (Löhrke & Hesse, 1980).

Tab. VIII (S. 80) zeigt die Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität in den oben kurz charakterisierten Rattenhepatomen, die entsprechend ihrer Wachstumsrate als Maß für die biologische Malignität aufgelistet sind. Die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol des mittelschnell wachsenden Morris Hepatom 5123tc entspricht in etwa der Enzymaktivität der normalen Leber. Aus Tab. VIII geht hervor, daß die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität mit zunehmender Wachstumsrate der Hepatome stufenweise vom Morris Hepatom 5123tc über die Morris Hepatome 7777 und 3924, das Novikoff Hepatom sowie das Yoshida Ascites Hepatom AH-130 bis zum am schnellsten proliferierenden Zajdela Ascites Hepatom abnimmt. Im Cytosol der Morris Hepatome 7777 und 3924 beträgt die Enzymaktivität 34 % bzw. 24 % der normalen Rattenleberaktivität. Die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol des Novikoff Hepatom und des Yoshida Ascites Hepatom AH-130 beträgt 15 % bzw. 11 % derjenigen der normalen Leber. Das Zajdela Hepatom hat praktisch keine meßbare Nikotinamidmethylaseaktivität und ist somit vergleichbar mit derjenigen der anaplastischen non-hepatischen Yoshida Sarkomzellen, Ehrlich Ascites Tumorzellen und Sarkom 180 Zellen. Die außergewöhnlich niedrige Enzymaktivität im Cytosol der langsam wachsenden

Tab. VIII: Verteilung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von Rattenhepatomen, anaplastischen non-hepatischen Ascitestumorzellen und in den Lebern der tumortragenden Tiere

	Tumorstadium [Tage zwischen den Tumortransplantationen]	histologischer Differenzierungsgrad des Tumors	Nikotinamidmethylaseaktivität [nmol 1-Methylnikotinamid/mg Protein/ 30 Minuten]	
			Tumor	Leber der tumortragenden Tiere
normale erwachsene Rattenleber			9,3 ± 2,8 (12)	
Morris Hepatom 9618A	400	hoch	1,3 ± 0,5 ^b (6)	4,0 ± 1,2 ^b (6)
Morris Hepatom 9121	60	mittelhoch	0,3 ± 0,05 ^b (6)	6,4 ± 1,2 ^a (3)
Morris Hepatom 5123tc	35	mäßig	10,8 ± 3,5 ^a (5)	3,0 ± 0,5 ^b (4)
Morris Hepatom 7777	28	niedrig	3,2 ± 0,5 ^b (6)	7,1 ± 1,1 ^a (3)
Morris Hepatom 3924	21	niedrig	2,2 ± 0,2 ^b (6)	12,6 ± 2,1 ^c (6)
Novikoff Hepatom	14	sehr niedrig	1,4 ± 0,2 ^b (5)	12,3 ± 1,0 ^c (5)
Yoshida Ascites Hepatom AH-130	10	sehr niedrig	1,0 ± 0,1 ^b (6)	8,6 ± 1,4 ^a (6)
Zajdela Ascites Hepatom	5	sehr niedrig	<0,05 ^b (5)	10,0 ± 3,4 ^a (4)
Yoshida Ascites Sarkom	3 - 4	anaplastisch	<0,05 ^b (4)	9,8 ± 2,1 ^a (4)
normale erwachsene Mausleber			0,9 ± 0,6 (6)	
Ehrlich Ascites Tumor	7	anaplastisch	<0,05 ^b (5)	1,1 ± 0,5 ^a (5)
Sarkom 180	7	anaplastisch	<0,05 ^b (6)	0,8 ± 0,3 ^a (6)

In einem Spektrum von Rattenhepatomen und anaplastischen non-hepatischen Ascitestumorzellen sowie in den Lebern der tumortragenden Tiere wurde die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (s. S. 37) beschrieben gemessen. In der Tabelle sind die Tumoren entsprechend ihrer zunehmenden Wachstumsrate und abnehmenden histologischen Differenzierung als Maß für die biologische Malignität angeordnet.

Die Angaben über die Tumorstadiums und die histologischen Differenzierungsgrade wurden aus den Arbeiten von Burk et al. (1967); Ferdinandus et al. (1971); Knox (1972a); Lawson et al. (1975, 1977); Lührke & Hesse (1980, 1981); Morris (1965); Morris & Chris (1977a, 1977b), Morris & Slaughter (1979); Morris & Wagner (1968); Novikoff (1957); Perin et al. (1978); Weber (1977) und Yoshida (1957, 1971) übernommen.

Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 - 6 einzelnen soliden Tumoren bzw. den Ascitestumorzellen der tumortragenden Tiere und den dazugehörigen Lebern. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tumoren und Lebern angegeben.

Die Daten für die Nikotinamidmethylaseaktivität in den Tumoren und den Lebern der tumortragenden Tiere wurden bezüglich ihrer Unterschiedlichkeit zur Enzymaktivität in der normalen erwachsenen Rattenleber bzw. Mausleber mit dem Wilcoxon-Test analysiert (Imnich, 1974; Ramm & Hoffmann, 1976).

^a: nicht signifikant

^b: p < 0,001

^c: p < 0,05

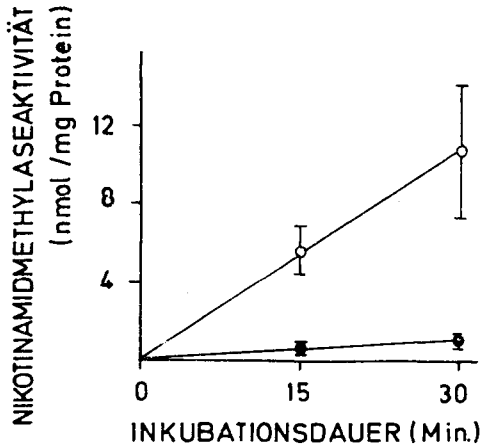


Abb. 10: Zeitabhängigkeit der Nikotinamidmethylasereaktion im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc und des Novikoff Hepatom.

Im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc und des Novikoff Hepatom wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität für 15 und 30 Minuten wie in 2.2.1. (s. S. 37) beschrieben bei 37° C mit 5 mM Nikotinamid und 210 μ M S-Adenosyl-[methyl-³H]methionin als Substraten gemessen.

Jeder Punkt in den Kurven stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf einzelnen Tumoren dar.

(-o-o-) Morris Hepatom 5123tc; (-●-●-) Novikoff Hepatom

Morris minimal deviation Hepatome 9618A und 9121, die 14 % bzw. 3 % der normalen Rattenleberaktivität beträgt, paßt nicht in diese Regel.

Abb. 10 (S. 81) veranschaulicht, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in dem mittelschnell wachsenden und mäßig differenzierten Morris Hepatom 5123tc wesentlich höher ist als in dem undifferenzierten und schnell wachsenden Novikoff Hepatom. Man sieht außerdem, daß die Nikotinamidmethylasereaktion im Cytosol der beiden Hepatome bis zu einer Inkubationsdauer von 30 Minuten linear verläuft.

Abb. 11 (S. 83) zeigt die Dünnschichtschromatographieprofile der Reaktionsansätze für die Bestimmung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc und des Zajdela Ascites Hepatom. Es wird illustriert, daß im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc Methylgruppen vom S-Adenosyl-[methyl-³H]methionin auf das Nikotinamid transferiert werden und 1-[Methyl-³H]nikotinamid synthetisiert wird, während im Gegensatz dazu in dem Cytosol des sehr niedrig differenzierten und sehr schnell proliferierenden Zajdela Ascites Hepatom praktisch kein 1-[Methyl-³H]nikotinamid synthetisiert wird.

In allen untersuchten transplantierbaren Rattenhepatomen mit Ausnahme des Morris Hepatom 5123tc ist die Nikotinamidmethylaseaktivität wesentlich niedriger als in der normalen erwachsenen Rattenleber. Die vorliegenden Resultate zeigen, daß es mit Ausnahme der sehr langsam proliferierenden Morris minimal deviation Hepatome 9618A und 9121 eine umgekehrte Korrelation zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der Tumorstadiumsrate gibt, die auch die anaplastischen non-hepatischen Ascitestumoren mit einbezieht (Tab. VIII, S. 80).

Es wurde ferner die Nikotinamidmethylaseaktivität in den Lebern der hepatomtragenden Ratten gemessen (Tab. VIII). Keine der analysierten Lebern zeigte makroskopisch Metastasen. Die Lebern der Ratten, denen die Morris Hepatome 9121 und 7777, das Yoshida Hepatom AH-130 und das Zajdela Hepatom transplantiert wurden, haben eine Nikotinamidmethylaseaktivität, die sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der gesunden Tiere unterscheidet. Die Enzymaktivität in der Leber von Ratten, die das Morris Hepatom 9618A und 5123tc trugen, ist statistisch hochsignifikant niedriger und beträgt nur 43 % bzw. 32 % derjenigen der normalen Rattenleber. In den Lebern der Ratten mit dem Morris Hepatom 3924 und dem Novikoff Hepatom ist die Nikotinamidmethylaseak-

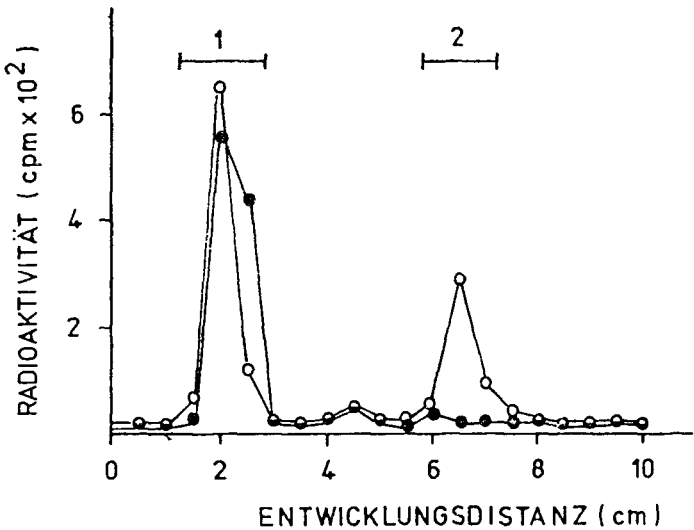


Abb. 11: Dünnschichtchromatographieprofil der Reaktionsansätze für die Bestimmung der Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc und des Zajdela Ascites Hepatom.

Im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc und des Zajdela Hepatom wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität wie in 2.2.1. (S. 37) beschrieben mit 5 mM Nikotinamid und 210 μ M S-Adenosyl-[methyl-³H]methionin (11,8 Ci/mol) als Substraten gemessen. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 μ l des alkoholischen Extraktes auf Zelloid-Dünnschichtchromatographieplatten mit dem von Swiatek et al. (1973) beschriebenen Laufmittel aus 1-Butanol, Essigsäure und Wasser entwickelt.

Die Position des 1-Methylnikotinamid wurde durch UV-Absorption bei 254 nm identifiziert.

1 = S-Adenosyl-[methyl-³H]methionin,

2 = 1-[Methyl-³H]nikotinamid

Die Chromatogramme wurden in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität gemessen.

(-o-o-) Morris Hepatom 5123tc; (-●-●-) Zajdela Ascites Hepatom

tivität um ungefähr 35 % höher als in der Kontrolleber. Die hepatische Nikotinamidmethylaseaktivität der Tiere mit den anaplastischen non-hepatischen Ascitestumoren unterscheidet sich nicht von derjenigen der gesunden Kontrolltiere, wie bereits in 3.3.1. (S. 71) dargestellt wurde. Es gibt also keine Korrelation zwischen der Enzymaktivität in der Leber der tumortragenden Tiere und der Malignität des Tumors.

3.3.3.2. Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschnittkulturen mit soliden Rattenhepatomen und in Zellkulturen mit Asciteshepatomzellen

In Tab. IX (S. 86) sind die Ergebnisse für die Gewebeschnitt- und Zellkultur-experimente mit den verschiedenen transplantierbaren Rattenhepatomen zusammengefaßt. Tab. IX zeigt, daß die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]Nikotinamid in den soliden Hepatomen im Vergleich zur normalen Kontrolleber um das 2 - 3-fache höher ist.

Die sehr langsam proliferierenden Morris minimal deviation Hepatome 9618A und 9121, die beide eine niedrige cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität haben, zeigen in den Gewebeschnittkulturexperimenten mit $36,5 \mu\text{M}$ [^{14}C]Nikotinamid ($44,1 \text{ Ci/mol}$) im Kulturmedium eine absolute [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate, die nur 29 % bzw. 27 % derjenigen der normalen erwachsenen Kontrolleber beträgt. Die relative 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in den Morris Hepatomen 9618A und 9121 beträgt nur 13 % bzw. 9 % derjenigen der normalen Kontrolleber. Der Quotient

$$\frac{1\text{-MNAM}}{\text{NAD}}$$

demonstriert, daß die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid im Verhältnis zur [^{14}C]NAD-Inkorporation in diesen beiden sehr langsam proliferierenden Hepatomen nur 30 % bzw. 10 % derjenigen der normalen Leber ausmacht.

Das Morris Hepatom 5123tc, das die höchste Nikotinamidmethylaseaktivität von allen untersuchten transplantierbaren Rattenhepatomen besitzt, zeigt auch in den Gewebeschnittkulturexperimenten die höchste Radioaktivitätsinkorporationsrate in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid von allen soliden Hepatomen. Die absolute und relative [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate im Morris Hepatom

5123tc sind ungefähr vier- bzw. zweimal höher als in der normalen Rattenleber, obwohl die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol des Morris Hepatom 5123tc nur um 16 % (statistisch nicht signifikant) höher als in der Kontrollleber ist (Tab. VIII, S. 80; Tab. IX, S. 86). In Relation zur [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate ist die [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate im Morris Hepatom 5123tc mehr als dreimal so hoch wie in der normalen Rattenleber.

Im Morris Hepatom 7777 ist die absolute Inkorporationsrate in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid um 63 % höher als in der normalen Leber, obgleich die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität in diesem Hepatom nur 34 % derjenigen der Kontrolleber beträgt. Hingegen beträgt die relative [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate 74 % derjenigen der normalen Rattenleber. In Relation zur [^{14}C]NAD-Inkorporation ist die [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporation im Morris Hepatom 7777 um 25 % größer als in der normalen Kontrolleber.

Sowohl die absolute als auch die relative [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate sind im Morris Hepatom 3924 zwei- bzw. dreimal so hoch wie in der normalen Rattenleber, obwohl die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität in diesem Tumor nur 24 % der Rattenleberaktivität beträgt.

In Relation zur [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate ist die [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate im Morris Hepatom 3924 fünfmal so hoch wie in der normalen erwachsenen Rattenleber.

Ähnlich wie bei den Morris Hepatomen 7777 und 3924 wurde beim Novikoff Hepatom eine erhebliche Diskrepanz zwischen der niedrigen cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität und der hohen 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Hepatomschnittkulturexperimenten beobachtet. Die absolute [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate im Novikoff Hepatom ist fast doppelt so hoch wie in der Kontrolleber, obwohl die Nikotinamidmethylaseaktivität dieses Tumors nur 15 % der Normalleberaktivität beträgt. Macht die relative 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in diesem Hepatom 70 % derjenigen der Vergleichsleber aus, so ist die [^{14}C]1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in Relation zur [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate im Novikoff Hepatom dreimal so hoch wie in der Normalleber.

In den Yoshida Ascites Hepatomzellen AH-130 ist die zelluläre [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate ganz außergewöhnlich hoch. Die absolute und die re-

Tab. IX: Metabolische Inkorporation von [14 C]Nikotinamid in das [14 C]NAD und [14 C]1-Methylnikotinamid in Gewebeschneidkulturen mit soliden Rattenhepatomen und in Zellkulturen mit Ascitestumorzellen

		absolute Inkorporationsraten [pmol/mg Protein/90 Minuten]			relative Inkorporationsraten		
		Nikotinamid (NAM)	NAD	1-Methylnikotinamid (1-MNAM)	NAD NAM	$\frac{1-MNAM}{NAM}$	$\frac{1-MNAM}{NAD}$
normale erwachsene Rattenleber	(6)	111,1 ± 27,9	130,7 ± 36,2	26,1 ± 18,4	1,18	0,23	0,20
Morris Hepatom 9618A	(3)	241,3 ± 30,3	127,9 ± 19,7	7,6 ± 0,3	0,53	0,03	0,06
Morris Hepatom 9121	(4)	314,8 ± 11,0	348,6 ± 34,8	7,0 ± 1,2	1,11	0,02	0,02
Morris Hepatom 5123tc	(3)	187,3 ± 13,0	149,2 ± 24,2	99,1 ± 18,2	0,80	0,53	0,66
Morris Hepatom 7777	(4)	255,6 ± 17,0	173,2 ± 59,5	42,5 ± 24,1	0,68	0,17	0,25
Morris Hepatom 3924	(4)	236,1 ± 40,9	89,2 ± 17,0	87,4 ± 9,9	0,38	0,37	0,98
Novikoff Hepatom	(4)	301,8 ± 34,7	84,7 ± 34,7	49,2 ± 18,6	0,28	0,16	0,58
Yoshida Ascites Hepatom AH-130	(4)	369,5 ± 40,0	660,5 ± 67,5	163,7 ± 10,0	1,79	0,44	0,25
Zajdela Ascites Hepatom	(5)	92,9 ± 17,1	869,7 ± 256,2	0,8 ± 0,2	9,36	<0,01	<0,01
Yoshida Ascites Sarkom	(3)	198,1 ± 17,6	444,5 ± 162,9	0,7 ± 0,2	2,24	<0,01	<0,01
Ehrlich Ascites Tumor	(4)	158,1 ± 17,4	514,0 ± 18,6	0,6 ± 0,1	3,25	<0,01	<0,01
Sarkom 180	(4)	130,2 ± 19,2	413,7 ± 42,4	0,6 ± 0,2	3,18	<0,01	<0,01

100 mg Gewebeschnitte von soliden Rattenhepatomen bzw. 100 mg Ascitestumorzellen (10 Minuten mit 270 x g zentrifugiert) wurden wie in 2.2.2. (S. 40) beschrieben inkubiert.

Die Tumoren sind wie in Tab. VIII (S. 80) entsprechend ihrer zunehmenden Wachstumsrate aufgelistet.

Die Daten sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 - 5 soliden Tumoren bzw. den Ascitestumorzellen der tumortragenden Tiere. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tumoren bzw. der tumortragenden Tiere angegeben.

relative [^{14}C]-1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in diesen Tumorzellen sind sechs- bzw. zweimal höher als in den Leberschnitten gesunder Ratten, obgleich die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität in den Yoshida Ascites Hepatomzellen AH-130 nur ungefähr 10 % der normalen Rattenleberaktivität beträgt.

Die Zajdela Ascites Hepatomzellen haben eine kaum meßbare cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität, und auch die lebenden Zajdela Ascites Hepatomzellen synthetisieren lediglich äußerst geringe Mengen [^{14}C]-1-Methylnikotinamid mit $36,5 \mu\text{M}$ [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium.

Die chromatographische Analyse der Produkte des [^{14}C]Nikotinamid im Extrakt von Zajdela Ascites Hepatomzellen ergab, daß das [^{14}C]NAD das einzige nachweisbare radioaktiv markierte Produkt in bedeutender Quantität ist (Abb. 12, S. 88). Diese Ergebnisse zeigen, daß die undifferenzierten Zajdela Ascites Hepatomzellen in bezug auf die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität und im Hinblick auf den Metabolismus von [^{14}C]Nikotinamid in den lebenden Tumorzellen den anaplastischen Ascitestumorzellen non-hepatischen Ursprungs (Ehrlich Ascites Tumorzellen, Sarkom 180 Zellen, Yoshida Ascites Sarkomzellen) sehr ähnlich sind (Abb. 8, S. 73; Abb. 12, S. 88; Tab. VIII, S. 80; Tab. IX, S. 86).

Zusammenfassend ergibt sich mit den langsam proliferierenden Morris minimal deviation Hepatomen 9618A und 9121 sowie mit dem von allen untersuchten Hepatomen am schnellsten proliferierenden Zajdela Ascites Hepatom eine gute Übereinstimmung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den lebenden Zellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium. Hingegen gibt es in den mittelschnell proliferierenden Morris Hepatomen 5123tc, 7777 und 3924 sowie in dem rasch proliferierenden Yoshida Ascites Hepatom AH-130 und dem Novikoff Hepatom keine erkennbare Übereinstimmung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität im Tumorcytosol und der [^{14}C]-1-Methylnikotinamidsyntheserate in den intakten Hepatomzellen. Vielmehr ist die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in diesen Hepatomen wesentlich höher, als es nach den Resultaten für die Nikotinamidmethylaseaktivitätsbestimmung erwartet worden wäre. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen werden in 4.1. (S. 101) und 4.5. (S. 118) diskutiert.

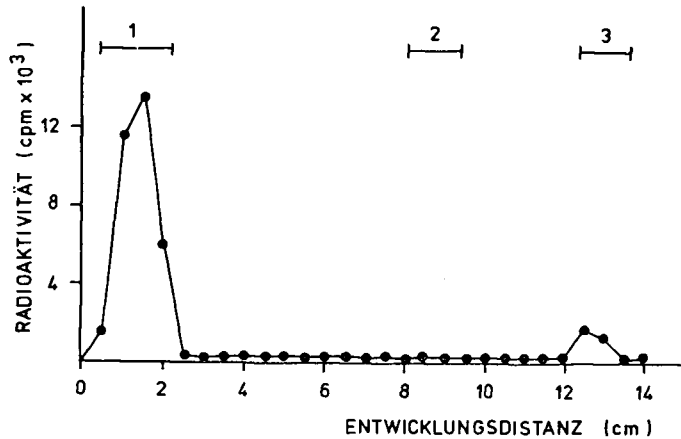


Abb. 12: Dünnschichtchromatographieprofil der Produkte des [¹⁴C]Nikotinamid in Zajdela Ascites-Hepatomzellen.

100 mg Zajdela Ascites-Hepatomzellsediment (10 Minuten mit 270 x g zentrifugiert) mit $4,9 \times 10^7$ Zellen wurden für 90 Minuten bei 37° C in 3 ml Eagle's basal Medium mit 2 mM L-Glutamin und 36,5 µM [¹⁴C]Nikotinamid (44,1 Ci/mol) inkubiert. 10 µl des alkoholischen Zellextraktes wurden auf Zellulose Dünnschichtchromatographieplatten mit dem von Witholt (1971) beschriebenen Laufmittel aus Zitronensäure, Ammoniumchlorid, Ethanol und Wasser entwickelt.

Die Positionen der nicht radioaktiv markierten authentischen Standardsubstanzen, die durch UV-Absorption bei 254 nm identifiziert wurden, sind durch die Balken angegeben.

1 = NAD, 2 = 1-Methylnikotinamid; 3 = Nikotinamid

Das Chromatogramm wurde in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivität gemessen.

3.4. Nikotinamidmethylierung in RLC-Zellen

3.4.1. Nikotinamidmethylaseaktivität in RLC-Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen

RLC-Zellen sind in der Zellkultur etablierte Hepatomzellen, die ursprünglich von der normalen Rattenleber abstammen, im Verlaufe der Zellkulturpassagen jedoch spontan zu schnell proliferierenden Hepatomzellen transformierten. Daß es sich bei den RLC-Zellen tatsächlich um Hepatomzellen handelt, wurde in chromosomenanalytischen, morphologischen und biochemischen Untersuchungen gezeigt (Gerschenson et al., 1970; Oshiro et al., 1972; Schamhart et al., 1979; Studinger, 1979; Volman, 1978).

Daher sollte zunächst untersucht werden, ob RLC-Zellen aktiv Nikotinamid methylieren, und ob sich die Nikotinamidmethylaseaktivität in diesen rasch proliferierenden Hepatomzellen (Zellpopulationsverdopplungszeit = 18 h) (Schamhart et al., 1979) von derjenigen der normalen Rattenleber unterscheidet. Die bisher vorgestellten eigenen Ergebnisse zeigen, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in allen rasch proliferierenden transplantierbaren Rattenhepatomen wesentlich niedriger als in der normalen Kontrolleber ist (Tab. VIII, S. 80). Außerdem war in Hinblick auf die mitogene Wirkung von 1-Methylnikotinamid in den RLC-Zellen (Hoshino et al., 1982b) und die Wachstumsphasenabhängigkeit der Nikotinamidmethylaseaktivität in der regenerierenden und fetalen Rattenleber (Hoshino et al., 1982a; Abb. 5, S. 60; Tab. V, S. 61) zu untersuchen, ob es auch in den RLC-Zellen eine Wachstumsphasenabhängigkeit der Nikotinamidmethylierung gibt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde im Cytosol von RLC-Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase die Nikotinamidmethylaseaktivität gemessen. In Tab. X (S. 92) ist das methodische Vorgehen beschrieben, um logarithmisch proliferierende und stationäre RLC-Zellen zu erhalten. Zum Zeitpunkt der Zellernte hatten die logarithmisch proliferierenden Zellen erst 25 % der maximal möglichen Zelldichte erreicht. 10 - 12 % aller Zellen in den Zellkulturen mit den logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen waren in der Mitose (M-Phase) und hatten die für diese Zellzyklusphase charakteristische sphärische Form (Watson, 1977a). Abb. 13a (S. 91) zeigt schematisch einen typischen Ausschnitt aus einer Zellkultur mit den logarithmisch proliferierenden Zellen, wie er sich unter dem Phasenkontrastauflichtmikroskop

darstellte. Die einzelnen, in dieser Wachstumsphase typischerweise spindelig geformten RLC-Zellen mit ihren zipfeligen Cytoplasmafortsätzen haben noch keinen Kontakt miteinander aufgenommen. Man erkennt außerdem die nur lose am Flaschenboden fixierten abgerundeten mitotischen Zellen, die sich in den verschiedenen Phasen der Zellteilung bis zur endgültigen Tochterzellbildung befinden. Es ist bemerkenswert, daß die Morphologie der logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen, die sich nicht gerade in der M-Phase befinden, mehr Ähnlichkeit mit Fibroblasten als mit Zellen epithelialer Abstammung hat. Die Abhängigkeit der Zellform kultivierter Zellen epithelialen Ursprungs von der Wachstumsphase ist bereits für andere Karzinomzellen wie z.B. HeLa-Zellen gut dokumentiert worden (Watson, 1977a).

Die zur Bestimmung der Enzymaktivität geernteten stationären RLC-Zellen hatten die maximal mögliche Zelldichte von 204×10^3 Zellen/cm² erreicht. In Abb. 13b (S. 91) ist schematisch ein Ausschnitt aus einer Zellkultur mit stationären RLC-Zellen dargestellt. Mitotische Zellen sind nicht sichtbar. Man erkennt statt dessen einen dichten, typisch epithelial konfigurierten Zellrasen, der aus polygonal geformten ("pflastersteinartigen") und eng miteinander in Kontakt stehenden RLC-Zellen zusammengesetzt ist.

In den stationären nicht proliferierenden RLC-Zellen, deren Wachstum durch Kontaktinhibition in der frühen G₁-Phase nach Bildung eines konfluierenden Zellrasens gestoppt worden war (Schwarz et al., 1974; Watson, 1977a), ist die Nikotinamidmethylaseaktivität um 71 % höher als im Cytosol der logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen (Tab. X, S. 92). Die Enzymaktivität im Cytosol der stationären und logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen beträgt nur 57 % bzw. 33 % der normalen Rattenleberaktivität. Diese Befunde korrespondieren gut mit den eigenen Ergebnissen, die zeigen, daß eine im Vergleich zur normalen Rattenleber deutlich niedrigere Nikotinamidmethylaseaktivität eine ganz typische Eigenschaft rasch proliferierender und wenig differenzierter Hepatomzellen ist (Tab. VIII, S. 80).

Wenn die RLC-Zellen nicht mit der in 2.2.1.1. (S. 37) beschriebenen Ultraschallmethode geknackt werden, sondern durch mehrmaliges Einfrieren im Trokaneis-Ethanol-Gemisch und sofortiges Auftauen bei Zimmertemperatur (Hoshino et al., 1980, 1981) ist die Enzymaktivitätsausbeute im Cytosol der auf diese Weise homogenisierten Zellen um 70 % niedriger als in den mit Ultraschall

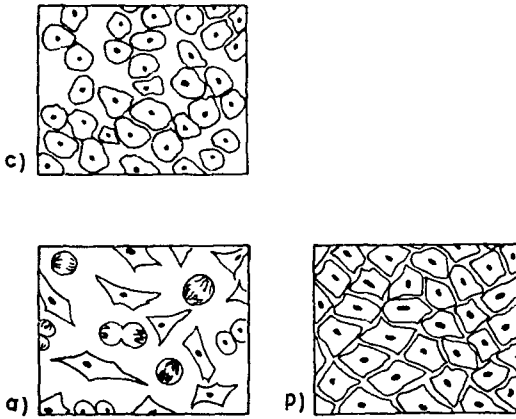


Abb. 13: Morphologie der RLC-Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

- a) logarithmisch proliferierende Zellen
- b) stationäre Zellen
- c) durch Serumentzug vorzeitig in der G_1 -Phase arretrierte Zellen

Tab. X: Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von RLC-Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase

	logarithmisch proliferierende RLC-Zellen	stationäre nicht proliferierende RLC-Zellen
Zelldichte zu Beginn der Kultur [Zellen/cm ²]	$15 \times 10^3 \pm 3 \times 10^3$	$78 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$
Zelldichte am Ende der Kultur (64 Stunden) [Zellen/cm ²]	$50 \times 10^3 \pm 11 \times 10^3$	$204 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$
Anzahl der M-Phase-Zellen am Ende der Kultur [M-Phase-Zellen/100 Zellen]	10 - 12	0
Nikotinamidmethylaseaktivität [nmol 1-Methylnikotinamid/mg Prot./30 Minuten]	$3,1 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,7^a$

Um logarithmisch proliferierende und stationäre RLC-Zellen zu erhalten, wurden RLC-Zellen von Stammkulturen mit einer Zelldichte von 160×10^3 Zellen/cm² mit den in der ersten Zeile der Tabelle angegebenen Zelldichten in Zellkulturflaschen eingesät und für 64 Stunden bei 37° C in minimal essential Medium Eagle mit 2 mM L-Glutamin, 0,1 % non essential Amino Acids und 5 % fetalem Kälberserum kultiviert. Am Ende der 64-stündigen Kulturzeit hatten die logarithmisch proliferierenden Zellen eine Dichte von 50×10^3 Zellen/cm² erreicht. Phasenkontrastmikroskopisch waren 10 - 12 sphärisch geformte mitotische (M-Phase) Zellen/100 Zellen auf dem Zellkulturflaschenboden zu erkennen. Im Gegensatz dazu hatten die stationären Zellen die maximal mögliche Dichte von 204×10^3 Zellen/cm² erreicht und wurden durch Kontaktinhibition in der frühen G₁-Phase an der weiteren Proliferation gehindert. Mikroskopisch waren keine sphärischen M-Phasen-Zellen in der Zellkultur erkennbar.

Die Zellen von 10 - 25 Kulturflaschen mit den Zellen aus der gleichen Wachstumsphase wurden mit dem Zellschaber geerntet und gesammelt. Die Nikotinamidmethylaseaktivität wurde wie in 2.2.1. (S. 37) beschrieben gemessen.

Die Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von acht Enzymaktivitätsbestimmungen. Die Daten wurden statistisch mit dem Wilcoxon-Test analysiert (Immich, 1974; Ramm & Hoffmann, 1976).

a: $p < 0,001$

Die Zellzahlen wurden in vier Kulturflaschen aus jeder Wachstumsphase bestimmt. Diese Daten sind ebenfalls die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

homogenisierten Zellen. Allerdings zeigt sich auch mit dem Cytosol der durch Einfrieren und Auftauen im Trockeneis geknackten Zellen, daß stationäre RLC-Zellen eine um 50 % höhere Enzymaktivität als die logarithmisch proliferierenden Zellen haben. Diese Ergebnisse sind nicht in einer Abbildung oder Tabelle gezeigt. Da bekannt ist, daß RLC-Hepatomzellen und gewisse andere Hepatomzellen wie z.B. Yoshida Hepatom AH-130 Zellen oder Zajdela Ascites Hepatomzellen eine sehr feste und rigide Zellmembran besitzen (Gerschenson et al., 1970; Perin et al., 1978; Schamhart, 1979), wurde die für die Gewinnung der cytosolischen Nikotinamidmethylase wesentlich effizientere Ultraschallhomogenisationsmethode angewendet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität von logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen mit der von RLC-Zellen verglichen, die durch Entzug des zum ungestörten Wachstum unbedingt notwendigen fetalen Kälberserums bereits vor Erreichen der maximal möglichen Zelldichte wachstumsinhibiert und in der frühen G₁-Phase arretiert wurden. Serumdeprivation im Kulturmedium ist eine sehr effiziente Maßnahme, um das Wachstum der Zellen in der G₁-Phase zu arretieren, ohne die Zellen dadurch in ihrer Vitalität und morphologischen Integrität zu beeinträchtigen (Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981; Schwartz et al., 1974; Watson, 1977a).

Tab. XI (S. 95) beschreibt das experimentelle Vorgehen und den Wachstumsverlauf der RLC-Zellen im Detail. Zunächst wurden die Zellen mit dem Kulturmedium, das 5 % fetales Kälberserum enthielt, angezchtet. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt. Um logarithmisch proliferierende RLC-Zellen ernten zu können, wurde die eine Gruppe von Zellen erneut mit frischem Medium versorgt, das 5 % fetales Kälberserum enthielt. Hingegen bekam die andere Gruppe von Zellen das Kulturmedium, das nur 0,1 % fetales Kälberserum enthielt, um die RLC-Zellen an der weiteren Proliferation zu hindern. Beide Gruppen von Zellen wurden unter diesen Bedingungen für weitere 40 Stunden kultiviert; anschließend wurde die Nikotinamidmethylaseaktivität gemessen.

Die logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen hatten sich nach dem Mediumwechsel um 380 % vermehrt, aber erst 37 % der maximal möglichen Zelldichte erreicht und zeigten im Gegensatz zu den durch Serumangel am Wachstum inhibierten RLC-Zellen einen hohen Prozentsatz an sphärisch geformten mitotischen Zellen. Die Morphologie der logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen

ist in Abb. 13a (S. 91) gezeigt und wurde bereits weiter oben beschrieben. Die Zelldichte in den RLC-Zellkulturen, die mit dem Serummangelmedium kultiviert wurden, nahm unter diesen Wachstumsbedingungen noch um 6 % zu. Diese geringe Zunahme ist darauf zurückzuführen, daß die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Zugabe des Serummangelmediums in der DNA-Synthesephase (S-Phase), Post-DNA-Synthesephase (G₂-Phase) oder in der Mitosephase (M-Phase) befanden, die Mitose vollendeten, um dann mit dem diploiden Chromosomensatz in der G₁-Phase arretiert zu werden (Watson, 1977a). Diese Gruppe von Zellen erreichte nicht die maximal mögliche Zelldichte von 204×10^3 Zellen/cm², sondern eine Dichte von nur 170×10^3 Zellen/cm². Abb. 13 c (S. 91) zeigt schematisch einen Ausschnitt aus einer Zellkultur mit RLC-Zellen, die für 40 Stunden mit dem Serummangelmedium kultiviert wurde. Man erkennt, daß die Zellen keinen konfluierenden Zellrasen gebildet haben, sondern dicht aggregiert in haufenförmiger Anordnung auf dem Flaschenboden haften. Die in dem Serummangelmedium gezüchteten Zellen haben weder das fibroblastenähnliche Aussehen der logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen, noch den pflastersteinartigen Charakter der im geschlossenen Epithelverband angeordneten stationären Zellen; ihre Form ist eher abgerundet, ohne zipfelartige Cytoplasmaausläufer. Mitotische Zellen sind nicht sichtbar. Eine Verwechslung der dicht beieinander liegenden im Serummangelmedium kultivierten Zellen mit den einzeln stehenden, ebenfalls abgerundeten RLC-Zellen aus der M-Phase ist kaum möglich, weil die mitotischen Zellen nur lose am Zellkulturflaschenboden haften und sich bei Strömungen im Kulturmedium deutlich sichtbar bewegen.

Die Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol der RLC-Zellen, die vorzeitig in der G₁-Phase des Zellzyklus wachstumsinhibiert wurden, ist um 67 % höher als im Cytosol der logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen (Tab. XI, S. 95). Die Enzymaktivität der durch Serumdeprivation in der G₁-Phase arretierten nicht proliferierenden RLC-Zellen ist derjenigen von stationären RLC-Zellen, die durch Kontaktinhibition nach Bildung eines konfluierenden Zellrasens in der G₁-Phase gestoppt wurden, sehr ähnlich (Tab. X, S. 92). Somit gibt es auch in den RLC-Zellen eine Wachstumsphasenabhängigkeit der Nikotinamidmethylaseaktivität: Die auf unterschiedliche Art und Weise wachstumsinhibierten nicht proliferierenden RLC-Zellen haben eine um rund 70 % höhere Nikotinamidmethylaseaktivität als die logarithmisch proliferierenden Zellen.

Tab. XI: Nikotinamidmethylaseaktivität im Cytosol von logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen und von RLC-Zellen, deren Wachstum durch Serumdeprivation vorzeitig in der G₁-Phase inhibiert wurde.

	logarithmisch proliferierende RLC-Zellen (40 Stunden-Kultur mit 5 % fetalem Kälberserum)	wachstumshinhibierte RLC-Zellen (40 Stunden-Kultur mit 0,1 % fetalem Kälberserum)
Zelldichte zu Beginn der Kultur (Zellen/cm ²)	15 x 10 ³ ± 3 x 10 ³	78 x 10 ³ ± 1 x 10 ³
Konzentration des fetalen Kälberserums im Kulturmedium	5 %	5 %
Zelldichte nach 24 Stunden (Zellen/cm ²)	20 x 10 ³ ± 3 x 10 ³	160 x 10 ³ ± 3 x 10 ³
Mediumwechsel: Konzentration des erneuerten fetalen Kälberserums im Kulturmedium	5 %	0,1 %
Zelldichte am Ende der Kultur (24 Stunden) (Zellen/cm ²)	76 x 10 ³ ± 5 x 10 ³	170 x 10 ³ ± 10 x 10 ³
Anzahl der M-Phase-Zellen am Ende der Kultur (M-Phase-Zellen/100 Zellen)	12 - 15	0
Nikotinamidmethylaseaktivität (nmol 1-Methylnikotinamid/mg Prot./ 10 Minuten)	3,0 ± 0,3	5,0 ± 0,4 ^a

RLC-Zellen wurden mit den in der ersten Zeile der Tabelle angegebenen Zelldichten in Zellkulturflaschen eingepflanzt und für 24 Stunden bei 37° C in minimal essential Medium Eagle mit 2 mM L-Glutamin, 0,1 % non essential amino Acids und 5 % fetalem Kälberserum kultiviert. Dann wurde das Kulturmedium mit PBS7 mehrfach ausgewaschen und erneuert. Um logarithmisch proliferierende Zellen ernten zu können, wurde die eine Gruppe erneut mit Medium, das 5 % fetales Kälberserum enthielt, versorgt. Die andere Gruppe von Zellen bekam ein Medium, das nur 0,1 % fetales Kälberserum enthielt, um das Wachstum der Zellen vorzeitig in der G₁-Phase zu arretieren (Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981; Schwartz et al., 1974; Watson, 1977a). Nach weiteren 40 Stunden Kulturzeit erreichten die logarithmisch proliferierenden Zellen eine Dichte von 76 x 10³ Zellen/cm² erreicht. Mit dem Phasenkontrastmikroskop waren 12 - 15 sphärische M-Phase-Zellen/100 Zellen in der Zellkultur sichtbar.

Die durch den Serumentzug wachstumshinhibierten RLC-Zellen hatten ihr Wachstum bei der submaximalen Dichte von 70 x 10³ Zellen/cm² eingestellt. Phasenkontrastmikroskopisch waren keine sphärischen M-Phase-Zellen in den Zellkulturen sichtbar.

Die Zellen von 10 - 25 Kulturflaschen der gleichen Wachstumsphase wurden mit dem Zellschaber geerntet und gesammelt. Die Nikotinamidmethylaseaktivität wurde wie in 2.2.1. (S. 37) beschrieben gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung von acht Enzymaktivitätsbestimmungen.

Die Daten wurden statistisch mit dem Wilcoxon-Test analysiert (Immich, 1974; Ramm & Hoffmann, 1976).

$p < 0,001$

Die Zellzahlen wurden in vier Kulturflaschen bestimmt und repräsentieren ebenfalls die Mittelwerte ± Standardabweichung.

3.4.2. Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Zellkulturen mit RLC-Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase

Zunächst wurde untersucht, welche die wichtigsten Produkte des Nikotinamids in den RLC-Zellen sind. Dazu wurden RLC-Zellen aus der stationären Wachstumsphase in minimal essential Medium Eagle mit 2 mM L-Glutamin und 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid (44,1 Ci/mol) inkubiert. Die radioaktiven Produkte im alkoholischen Zellextrakt wurden mit der Dünnschichtchromatographie analysiert. Abb. 14 (S. 97) demonstriert, daß wie in der normalen Rattenleber (Abb. 3, S. 54) [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid die einzigen nachweisbaren Produkte des [^{14}C]Nikotinamid in den RLC-Hepatomzellen sind.

Abb. 15 (S. 98) zeigt, daß stationäre RLC-Zellen unter den oben beschriebenen Bedingungen [^{14}C]Nikotinamid bis zu einer Inkubationsdauer von 90 Minuten mit nahezu konstanter Geschwindigkeit in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid inkorporieren. Die Inkorporation in das [^{14}C]NAD nimmt mit einer sich einem Plateau annähernden Kurve bis zu einer Inkubationsdauer von sechs Stunden stetig zu, wohingegen die Inkorporation in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid bereits nach drei Stunden ein Plateau erreicht. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Hoshino et al. (1984) mit Rattenleber gemacht: In Rattenleberschnitten, die mit 11,2 μM [^{14}C]Nikotinamid in Eagle's basal Medium inkubiert werden, verläuft die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]NAD und in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid bis zu einer Inkubationsdauer von 60 Minuten linear. Danach flacht die Inkorporation in das [^{14}C]1-Methylnikotinamid deutlich ab, während die in das [^{14}C]NAD weiter linear ansteigt.

Diese Beobachtungen könnten damit erklärt werden, daß das von den RLC-Zellen und den Rattenleberschnitten synthetisierte [^{14}C]1-Methylnikotinamid im Verlauf der Inkubation zu einem gewissen Anteil in das Inkubationsmedium sezerniert wird und so zu einer Stagnation der Radioaktivitätsinkorporation in die Fraktion des intrazellulären [^{14}C]1-Methylnikotinamid führt (siehe dazu auch die Ausführungen in 4.1., S. 101).

Es soll ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]Nikotinamid in den RLC-Zellen bereits sehr frühzeitig nach dem Inkubationsbeginn einen Gleichgewichtszustand erreicht (Abb. 15, S. 98). Dies bedeutet, daß die Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]NAD

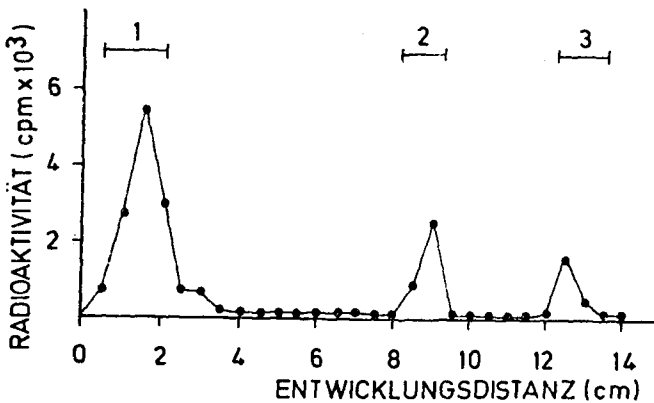


Abb. 14: Dünnschichtchromatographieprofil der Produkte des [¹⁴C]Nikotinamid in RLC-Zellen

100 mg Frischgewicht RLC-Zellen ($2,8 \times 10^7$ Zellen) von konfluierenden Zellkulturen wurden für 90 Minuten bei 37^o C in 3 ml minimal essential Medium Eagle mit 2 mM L-Glutamin, 0,1 % non essential Amino Acids und 36,5 μ M [¹⁴C]Nikotinamid (44,1 Ci/mol) inkubiert.

Die radioaktiven Produkte im alkoholischen Zellextrakt wurden dünnschichtchromatographisch wie in Abb. 12 (S. 88) und in 2.2.2. (S. 40) beschrieben analysiert.

1 = NAD;

2 = 1-Methylnicotinamid;

3 = Nikotinamid

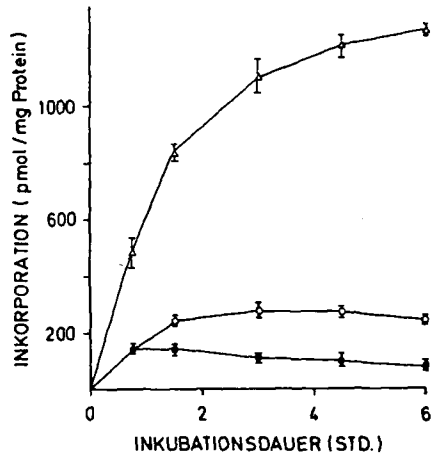


Abb. 15: Metabolische Inkorporation von $[^{14}\text{C}]$ Nicotinamid in das $[^{14}\text{C}]$ NAD und $[^{14}\text{C}]$ 1-Methylnicotinamid in stationären RLC-Zellen als Funktion der Inkubationsdauer

100 mg Frischgewicht RLC-Zellen ($2,8 \times 10^7$ Zellen) von konfluierenden Zellkulturen wurden für die angegebenen Zeiten bei 37°C in 3 ml minimal essential Medium Eagle mit 2 mM L-Glutamin, 0,1 % non essential Amino Acids und $36,5 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ Nicotinamid ($44,1 \text{ Ci/mol}$) inkubiert.

Die radioaktiven Produkte wurden dünnschichtchromatographisch analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei oder vier Inkubationen.

($-\Delta-\Delta-$) NAD; ($-o-o-$) 1-Methylnicotinamid; ($-\bullet-\bullet-$) Nicotinamid

und [^{14}C]1-Methylnikotinamid nicht auf Veränderungen innerhalb des [^{14}C]Nikotinamidpools in den RLC-Zellen zurückzuführen ist, sondern die metabolische Aktivität der Zellen bei einer konstanten intrazellulären Nikotinamidkonzentration repräsentiert (siehe dazu auch die Erläuterungen in 2.2.2., S. 40).

In einer weiteren Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob der Unterschied in der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität zwischen den stationären und logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen auch von einem entsprechenden Unterschied in der zellulären 1-Methylnikotinamidsyntheserate der intakten RLC-Zellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium begleitet wird. Dazu wurden die RLC-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie in Tab. X (S. 92) und in 3.4.1. (S. 89) ausführlich beschrieben kultiviert. Am Ende der 64-stündigen Kulturzeit wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet. Die Zellen aus jeder der beiden Wachstumsphasen wurden getrennt gesammelt, und die Radioaktivitätsinkorporationsraten in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid wurden gemessen. Tab. XII (S. 100) zeigt, daß die absolute und relative 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den stationären RLC-Zellen um 49 % bzw. um 76 % höher als in den logarithmisch proliferierenden Zellen sind. Somit wird die um rund 70 % höhere cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität in den stationären RLC-Zellen im Vergleich zu den logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen tatsächlich von einer entsprechend höheren zellulären 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den lebenden Zellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium begleitet.

Tab. XII: Metabolische Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid in Zellkulturen mit RLC-Zellen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase

	absolute Inkorporationsraten [pmol/mg Protein/90 Minuten]		relative Inkorporationsraten	
	Nikotinamid (NAM)	NAD	1-Methylniko- tinamid (1-MNAM)	$\frac{\text{1-MNAM}}{\text{NAM}}$ $\frac{\text{NAD}}{\text{NAM}}$ $\frac{\text{1-MNAM}}{\text{NAD}}$
logarithmisch proli- ferierende RLC-Zellen	274,3 ± 39,4	1357,4 ± 130,7	324,9 ± 31,2	4,95 1,18 0,24
stationäre nicht proli- ferierende RLC-Zellen	232,4 ± 10,0	1615,8 ± 29,9	483,6 ± 12,9 ^a	6,96 2,08 0,30

RLC-Zellen wurden mit den in Tab. X (S. 92) angegebenen Zelldichten in Zellkulturflaschen eingesät und für 64 Stunden wie in Tab. X beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden durch Trypsinierung geerntet. Die Zellen von 10 - 25 Kulturflaschen aus jeder Wachstumsphase wurden gesammelt und durch Zentrifugation mit 270 x g für 10 Minuten sedimentiert. 100 mg des Zellsediments ($2,8 \times 10^7$ Zellen) wurden dann wie in 2.2.2. (S. 40) beschrieben in 3 ml minimal essential Medium Eagle mit 2 mM L-Glutamin, 0,1 % non essential Amino Acids und 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid (44,1 Ci/mol) inkubiert. Die Inkorporationsraten von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD und [^{14}C]1-Methylnikotinamid wurden gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier Inkubationen. Die Daten wurden statistisch mit dem Wilcoxon-Test analysiert (Immich, 1974; Ramm & Hoffmann, 1976).

a: $p < 0,001$

4. DISKUSSION

4.1. Biochemische Bedeutung und Funktion der Nikotinamidmethylierung im Nikotinamidstoffwechsel der normalen erwachsenen Leber und der non-hepatischen Organe

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hoshino et al. (1982a, 1984) und Clark et al. (1975a) wird in dieser Arbeit gezeigt, daß die Rattenleber eine sehr große Synthesekapazität für die Produktion von 1-Methylnikotinamid besitzt. Dies wurde sowohl durch die Messung der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität als auch durch die Messung der metabolischen Inkorporation von radioaktiv markiertem Nikotinamid (Konzentration im Kulturmedium = 36,5 μM) in das 1-Methylnikotinamid in den lebenden Hepatocyten unter Anwendung der Schnittekulturrechnik demonstriert (Tab. II, S. 49; Tab. III, S. 50 ; Tab. IV, S. 53). Im Vergleich dazu sind die Nikotinamidmethylaseaktivität und die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in anderen parenchymatösen Organen wie Nebenniere, Pancreas, Niere und Gehirn niedrig und betragen weniger als 25 % derjenigen der Leber (Tab. II, III, IV). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Nikotinamidmethylierung in der Leber eine hervorragende physiologische Bedeutung im Nikotinamidstoffwechsel hat, derweil die Nikotinamidmethylierung in den non-hepatischen Organen jedoch von sekundärer Relevanz zu sein scheint.

Obwohl eine gute Übereinstimmung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Gewebeschnittekulturrexperimenten mit verschiedenen Organen besteht (Tab. II, III, IV), müssen einige wichtige Besonderheiten des Gewebeschnittekultursystems erläutert werden, die für Abweichungen der 1-Methylnikotinamidsyntheserate von der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität verantwortlich sein können:

Die Nikotinamidmethylaseaktivität wurde unter optimalen Substrat- und pH-Bedingungen gemessen. Im Gegensatz dazu beträgt die Nikotinamidkonzentration in dem für die Gewebeschnittekulturrexperimente benutzten Kulturmedium 36,5 μM und entspricht somit lediglich dem $\frac{K_m}{2}$ -Wert des für die Nikotinamidmethylierung ermittelten K_m -wertes für Nikotinamid ($K_m = 75 \mu\text{M}$; Hoshino et al., 1982a). Hoshino et al. (1984) zeigten, daß die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in Rattenleberschnitten innerhalb des physiologischen Konzentrationsbereiches

von 10 - 100 μM Nikotinamid im Medium direkt von dessen Konzentration im Kulturmedium abhängt, während bei höheren Nikotinamidkonzentrationen als 100 μM im Medium keine weitere Steigerung der 1-Methylnikotinamidsyntheserate zu beobachten ist. Somit könnte die unterschiedliche zelluläre [^{14}C]Nikotinamidkonzentration in den Gewebeschnitten der einzelnen Organe geschwindigkeitsmitbestimmend für die absolute Syntheserate von 1-Methylnikotinamid sein (Hoshino et al., 1982a, 1984).

Die in Tab. IV (S. 53) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die zelluläre Aufnahme des [^{14}C]Nikotinamid in die Gewebeschnitte nicht nur von Organ zu Organ variiert, sondern auch Differenzen zwischen Ratte und Maus bestehen. Ob der Transportmechanismus, über den das Nikotinamid von extrazellulär (aus dem Kulturmedium oder in vivo aus dem Blutserum) nach intrazellulär gelangt, ein Diffusionsvorgang oder aber ein aktiver Transport gegen einen Konzentrationsgradienten ist, wurde bisher noch nicht genau untersucht. Man weiß lediglich, daß in Rattenleberschnitten (Hoshino et al., 1984) und kultivierten Rattennierenzellen (Johnson, 1980a) eine Erhöhung der Nikotinamidkonzentration im Medium zu einem parallelen Anstieg der Nikotinamidkonzentration in den Zellen führt. Dies könnte als ein Anhaltspunkt für einen passiven Transport gewertet werden. Sadoogh-Abasian & Evered (1980) berichteten außerdem, daß Nikotinamid in der Darmmukosa der Ratte durch erleichterte bzw. passive Diffusion, nicht aber durch aktiven Transport absorbiert wird. Andererseits ist bekannt, daß die intrazelluläre Konzentration von Nikotinamid in verschiedenen normalen und malignen Zelllinien in der Zellkultur, in normalen Geweben und Tumoren keineswegs identisch ist, sondern innerhalb eines Bereiches von ca. 10 - 100 nmol Nikotinamid/g Gewebefrischgewicht variiert (Clark et al., 1975a; Gerber & Deroo, 1970; Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981; Märki & Greengard, 1966), ein Hinweis dafür, daß möglicherweise auch aktive Transportprozesse bei der zellulären Aufnahme von Nikotinamid eine Rolle spielen könnten. Es muß daher unbedingt geklärt werden, über welchen Mechanismus Nikotinamid in die Zellen von parenchymatösen Organen wie Leber, Niere und Gehirn sowie in Tumorzellen aufgenommen wird, da der Transportmechanismus die zelluläre Nikotinamidkonzentration und diese wiederum die Syntheserate von 1-Methylnikotinamid beeinflussen kann (Hoshino et al., 1984).

Außerdem müssen in den Gewebeschnittkulturexperimenten die intrazelluläre Konzentration von S-Adenosylmethionin als Methylendonator für die Synthese von 1-Methylnikotinamid und die Konzentration von S-Adenosylhomocystein als potenter Inhibitor der Nikotinamidmethylase (Clark et al., 1975a; Hoshino et al., 1982a; Swiatek et al., 1973) berücksichtigt werden. Es ist gut dokumentiert, daß die zelluläre Konzentration von S-Adenosylmethionin in den verschiedenen Rattenorganen variiert. Rattenleber hat die höchste S-Adenosylmethioninkonzentration (70 - 120 nmol/g Gewebefrischgewicht), die der anderen Organe liegt in einem Bereich von 90 nmol/g Gewebefrischgewicht (Nebenniere) bis 45 nmol/g Gewebefrischgewicht (Pancreas und Gehirn) (Baldessarini & Kopin, 1963; Hoffman et al., 1980; Lombardini & Talalay, 1973). Die Konzentration von S-Adenosylhomocystein in der Leber beträgt 8 - 20 nmol/g Gewebefrischgewicht (Hoffman et al., 1980). Berücksichtigt man in Zusammenhang mit diesen Daten den K_m -Wert der Nikotinamidmethylase für S-Adenosylmethionin (130 μ M) und den K_i -Wert für S-Adenosylhomocystein (10 μ M), so ist es durchaus denkbar, daß neben der Nikotinamidkonzentration auch die zellulären Konzentrationen von S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein geschwindigkeitsbestimmend für die Syntheserate von 1-Methylnikotinamid in den lebenden Zellen sein könnten, wie bereits von einigen Autoren vermutet wurde (Clark et al., 1975a; Hoshino et al., 1982a; Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981; Swiatek et al., 1973).

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration für die Nikotinamidmethylierung liegt bei pH 8,6 (Clark et al., 1975a; Hoshino et al., 1982a). Die Gewebeschnittkulturexperimente wurden jedoch in einem Kulturmedium ausgeführt, dessen Wasserstoffionenkonzentration "physiologisch" (pH 7,4) ist und somit von dem optimalen pH-Wert für die Nikotinamidmethylierung differiert. Es muß außerdem erwähnt werden, daß in den Gewebeschnittkulturexperimenten die im Nikotinamidmethylaseassay praktizierte Dithiothreitolaktivierung des Enzyms entfiel (Clark et al., 1975a; Hoshino et al., 1982a).

Schließlich muß in Betracht gezogen werden, daß das in den Zellen synthetisierte 1-Methylnikotinamid nicht nur intrazellulär verbleibt, sondern auch in das Kulturmedium sezerniert werden kann. Es ist bekannt, daß dies in einer Reihe von in der Zellkultur gezüchteten Zelllinien der Fall ist (Hillyard et al., 1973; Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981). Der Mechanismus dieser Sekretion ist weitgehend unbekannt. Sicher ist jedoch, daß 1-Methylnikotin-

amid in der Niere durch aktive tubuläre Sekretion eliminiert wird (Bennett et al., 1981; Berndt, 1978; Hirsch & Pakuts, 1974; Holohan & Ross, 1980; Jerauld & Silverblatt, 1978; Kinsella et al., 1979; Ross et al., 1975; Shim et al., 1982; Weiner, 1973). Daß die Sekretion von 1-Methylnikotinamid aus den Gewebeschnittkulturen und dessen Akkumulation im Kulturmedium jedoch zu einer wesentlichen Verringerung der Menge des intrazellulären [^{14}C]1-Methylnikotinamids und so zu einer bedeutenden Unterschätzung der tatsächlichen zellulären Syntheserate von 1-Methylnikotinamid führt, ist sehr unwahrscheinlich, denn die chromatographische Analyse des Kulturmediums, in dem Rattenleberschnitte für 90 Minuten mit physiologischen [^{14}C]Nikotinamidkonzentrationen inkubiert wurden, ergab, daß maximal 10 % des zellulär synthetisierten [^{14}C]1-Methylnikotinamids im Verlaufe der Inkubation nach extrazellulär sezerniert werden (eigene Ergebnisse, die nicht in einer Tabelle oder Abbildung gesondert gezeigt werden). Andererseits wurde auch berichtet, daß 1-Methylnikotinamid über einen aktiven Transportmechanismus aus dem Kulturmedium in Rattennierenschnitten nach intrazellulär aufgenommen und akkumuliert wird (Hirsch & Pakuts, 1974; Jerauld & Silverblatt, 1978). Ob dies auch für andere Zellen zutrifft, ist jedoch noch unbekannt.

Es gibt somit eine ganze Reihe von in ihrer quantitativen Bedeutung möglicherweise unterschiedlich wichtigen und weitgehend noch ungeklärten Faktoren, die in den Gewebeschnittkulturen Einfluß auf die zelluläre Syntheserate von 1-Methylnikotinamid nehmen können. Dies ist stets bei der Interpretation der hier gezeigten Schnittkulturexperimente insbesondere im Vergleich mit den Ergebnissen für die Nikotinamidmethylaseaktivitätsbestimmung zu berücksichtigen.

Die hier präsentierten Ergebnisse passen gut in das von Gholson (1968), Dietrich (1971) und Bernofsky (1980) entworfene Konzept, nach dem die hepatische Nikotinamidmethylierung ein wichtiges regulativ-homöostatisches Funktionselement in der Kontrolle der für den Organismus optimalen humoralen und zellulären Nikotinamidkonzentration darstelle, die in einem Bereich von 5 - 100 μM (nmol/g Gewebefrischgewicht) liegt (Bernofsky, 1980; Buddecke, 1978b; Clark et al., 1975a; Gerber & Deroo, 1970; Grunicke et al., 1969; Hoshino et al., 1982a; 1984; Keller et al., 1971; Märki & Greengard, 1966). Überschüssiges Nikotinamid, das nach der Resorption im Gastrointestinaltrakt durch passive und erleichterte Diffusion (Sadoogh-Abasian & Evered, 1980) über die Vena portae in die Leber gelangt, soll dort zum biologisch inaktiven 1-Me-

thylnikotinamid konvertiert und über den Urin ausgeschieden werden, um den Organismus vor den zytotoxischen Effekten unphysiologisch hoher Nikotinamidkonzentrationen ($>0,5$ mM) zu schützen (siehe dazu auch die ausführlichen Erläuterungen in 1.1., S. 7, und 1.3., S. 19).

In 1.3. wurde über eine Reihe von Ergebnissen referiert, die Hinweise für eine solche Involvierung der hepatischen Nikotinamidmethylierung in die Nikotinamidhomöostase des Organismus liefern: Die einmalige intraperitoneale Injektion einer unphysiologisch hohen Dosis von 4 mmol Nikotinamid/kg Körpergewicht induziert in der Rattenleber einen Anstieg der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität um 100 % (Gholson, 1968). Die alimentäre Zufuhr steigender Nikotinamidmengen in physiologischer und pharmakologischer Dosierung (0,15 - 0,85 mmol Nikotinamid/kg Körpergewicht/Tag) führt bei Ratten zu einer proportional gesteigerten Urinausscheidung von 1-Methylnikotinamid (Patterson & Harper, 1982b), während die Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid bei Nikotinamidmangelzuständen wie z.B. bei Pellagrapatienten deutlich verringert ist (Ellinger et al., 1945; Ellinger & Hardwick, 1947; Goldsmith, 1965; Huff & Perlzweig, 1943b; Kating & Drephal, 1974; Najjar & Holt, 1941, 1941b).

Allerdings ist diese Funktion der Nikotinamidmethylierung in der humoralen und zellulären Nikotinamidhomöostase keineswegs unumstritten, da es auch experimentelle Befunde gibt, die gegen diese Hypothese sprechen: Hoshino et al. (1984) zeigten in Gewebeschnittkulturexperimenten, daß die 1-Methylnikotinamidsynthese in den lebenden Hepatocyten der Ratte einen niedrigen K_m -Wert für Nikotinamid (50 μ M) und einen niedrigen V_{max} -Wert hat; bereits bei der physiologischen Konzentration von 0,1 mM Nikotinamid im Kulturmedium erreicht die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Leberschnitten ein Plateau und wird durch weitere Erhöhung der Nikotinamidkonzentration nicht mehr gesteigert. Im Gegensatz dazu hat die NAD-Synthese in den lebenden Hepatocyten einen hohen V_{max} -Wert und einen hohen K_m -Wert für Nikotinamid. Das bedeutete, daß die Nikotinamidmethylierungskapazität der Hepatocyten bei hyperphysiologischen Nikotinamidkonzentrationen ($>0,5$ mM) bereits gesättigt wäre und den nikotinamidinduzierten Anstieg der NAD-Syntheserate mit dem parallelen und letzten Endes wahrscheinlich für die Zytotoxizität des Nikotinamids verantwortlichen Verbrauch der energiereichen Verbindungen ATP und 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphat nicht verhindern könnte (siehe dazu auch 1.1., S. 7, und 1.3., S. 19). Außerdem zeigt Johnson (1980a), daß es in normalen Rattennie-

renzellen, die mit pharmakologischen Nikotinamidkonzentrationen (0,5 mM und 2,0 mM) im Medium kultiviert wurden, zu einem 7- und 20-fachen Anstieg der intrazellulären Nikotinamidkonzentration gegenüber den im Normalmedium mit 33 μ M Nikotinamid kultivierten Zellen kommt, jedoch nicht zu einem proportionalen Anstieg der 1-Methylnikotinamidsyntheserate.

Es ist durch zahlreiche Beispiele in der Literatur belegt, daß die Biosynthese und Urinausscheidung von 1-Methylnikotinamid im Organismus von verschiedenen hormonellen Faktoren beeinflußt werden kann (Brown et al., 1961; Ghollson, 1968; Greengard et al., 1967; Lojkin, 1956; Lojkin et al., 1952; Pasquariello, 1964; Sanada & Miyazaki, 1980; Wertz et al., 1958; siehe dazu auch 1.3., S. 19). Man könnte daher die Diskrepanzen zwischen den hier referierten eigenen in vitro- und den in vitro- sowie in vivo-Versuchsergebnissen anderer Autoren zumindest partiell mit den vielfältigen hormonellen Einflüssen auf die hepatische Nikotinamidmethylierung im intakten Organismus zu erklären versuchen.

Im Vergleich zur Rattenleber beträgt die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität der Mausleber nur 10 % derjenigen der Rattenleber (Tab. II, S. 49). Darüber hinaus weisen Mausleberschnitte, die mit 36,5 μ M [14 C]Nikotinamid im Kulturmedium inkubiert wurden, eine wesentlich niedrigere Radioaktivitätsinkorporation in das 1-Methylnikotinamid als Rattenleberschnitte auf (Tab. IV, S. 53).

Es ist in der Literatur in einer großen Anzahl von Arbeiten dokumentiert worden, daß der Katabolismus des Nikotinamids und die Ausscheidung der Endprodukte des NAD-Stoffwechsels im Urin bei verschiedenen Spezies qualitativ und quantitativ ganz erheblichen Variationen unterliegen (Brown & Price, 1956; Chang & Johnson, 1961; Chaykin et al., 1965; Ellinger & Abdel Kader, 1949; Felsted & Chaykin, 1967; Huff, 1947; Huff & Perlzweig, 1943a; Kating & Drephal, 1974; Knox & Grossman, 1947; Leifer et al., 1951; Najjar & Wood, 1940; Perlzweig et al., 1949; Petrack et al., 1966; Shaik et al., 1977; Stanulović & Chaykin, 1971). Beispielsweise scheiden Kaninchen, Rind, Schaf und Pferd nur äußerst geringe Mengen 1-Methylnikotinamid im Urin aus (Perlzweig et al., 1949). Ferner ist bekannt, daß Leberextrakte dieser Spezies keine meßbare Nikotinamidmethylaseaktivität haben (Cantoni, 1951). Andererseits ist das 1-Methylnikotinamid in Hund, Ratte und beim Menschen das quantitativ bedeu-

tendste Endprodukt des Nikotinamidkatabolismus; bei beiden Tierarten und beim Menschen beträgt der quantitative Anteil des 1-Methylnikotinamid an den Nikotinamidmetaboliten im Urin 70 - 95 % (Ellinger & Abdel Kader, 1949; Johnson et al., 1945; Kating & Drephal, 1974; Leifer et al., 1951; Perlzweig et al., 1949). Im Vergleich zur Ratte ist das 1-Methylnikotinamid bei der Maus ein in quantitativer Hinsicht weniger bedeutendes Endprodukt des Nikotinamidstoffwechsels im Harn (<20 % der Nikotinamidmetaboliten), während bei dieser Spezies das Nikotinamid-N-Oxid (40 - 50 %) und das unverstoffwechselte Nikotinamid (30 - 50 %) eine wesentlich größere Rolle als Exkretionsprodukte des NAD-Stoffwechsels im Urin spielen (Bonavita et al., 1961; Chaykin et al., 1965; Collins & Chaykin, 1971; Kating & Drephal, 1974; Leifer et al., 1951). Daher sollte die hohe hepatische Nikotinamidmethylaseaktivität und 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Leberschnitten der Ratte mit der prozentual und absolut hohen 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin dieser Nager korrespondieren, währenddessen sich die wesentlich niedrigere Nikotinamidmethylierungskapazität der Mausleber in der relativ und absolut geringeren Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid im Urin dieser Spezies widerspiegelt. Insofern wäre die niedrige cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität der Mausleber ein Ausdruck der Tatsache, daß der Pyridinnucleotidkatabolismus in der Maus bevorzugt zum Nikotinamid sowie Nikotinamid-N-Oxid und nicht wie bei der Ratte zum 1-Methylnikotinamid führt. Diese Resultate deuten darauf hin, daß die quantitative physiologische Bedeutung der Nikotinamidmethylierung im Hinblick auf die ihr zugesprochene regulativ-homöostatische Kontrollfunktion im NAD-Stoffwechsel nicht nur in verschiedenen Organen, sondern auch in verschiedenen Spezies unerwarteterweise offensichtlich ganz unterschiedlich ist.

Es besteht nunmehr kein Zweifel daran, daß nachfolgende Studien, die den Regulationsmechanismus und die physiologische Funktion der Nikotinamidmethylierung aufzuklären versuchen, am allerbesten mit der Rattenleber durchgeführt werden sollten, da dieses Organ die höchste Nikotinamidmethylierungskapazität von allen untersuchten Organen besitzt (Tab. II, S. 49; Tab. III, S. 50; Tab. IV, S. 53). Einige Untersuchungen, die die Aufklärung der Funktion der Nikotinamidmethylierung im NAD-Stoffwechsel zum Ziel hatten, wurden mit kultivierten Rattennierenzellen durchgeführt, ohne daß diese Arbeiten eindeutig zu interpretierende Resultate erbracht hätten (Johnson, 1980a; Johnson & Chiang, 1981). Ob diese kultivierten normalen Rattennierenzellen für die Beantwortung dieser Fragestellung das geeignete Versuchsmodell sind, ist frag-

lich, da die Nikotinamidmethylierungskapazität der normalen erwachsenen Rattenniere verhältnismäßig niedrig ist (Tab. II, S. 49; Tab. III, S. 50; Tab. IV, S. 53).

Diese Arbeit legt dar, daß die meisten parenchymatösen Organe von Ratte und Maus Nikotinamid methylieren, wenn auch in einem erheblich geringeren Maße als die Rattenleber (Tab. II, III, IV). In einer Reihe von Arbeiten wurde berichtet, daß viele in der Zellkultur etablierte Zelllinien und bestimmte Tumorzellen Nikotinamid methylieren können (Bernofsky, 1980; Clark et al., 1975a; Hillyard et al., 1973; Jacobson et al., 1979; Johnson, 1980a, 1980b, 1981; Johnson & Chiang, 1981; Olivera & Ferro, 1982; Swiatek et al., 1973) (Details werden in 1.3., S. 19, referiert). Die Nikotinamidmethylierung ist also keineswegs ausschließlich auf das Lebergewebe beschränkt, sondern vielmehr ein Prozeß, der auch in quantitativ variierender Intensität in einer erstaunlich großen Anzahl von Zellen und Geweben non-hepatischen Ursprungs vorkommt. In den in dieser Arbeit untersuchten Organen der Ratte (Leber, Nebenniere, Pancreas, Niere und Gehirn) und der Maus (Leber, Niere und Gehirn) konnte keine erkennbare Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylierungskapazität, der NAD-Syntheserate sowie der NAD-Konzentration dieser Organe festgestellt werden (Tab. II, III, IV; Abb. 4, S. 57). Welche Bedeutung die Nikotinamidmethylierung in den non-hepatischen Geweben und Zellarten für die Regulation des zellulären NAD-Stoffwechsels besitzt, bleibt daher noch völlig ungeklärt. In kultivierten Rattennierenfibroblasten jedenfalls ist eine regulatorische Funktion der Nikotinamidmethylierung für die Aufrechterhaltung der optimalen zellulären Nikotinamidkonzentration unwahrscheinlich, denn ansteigende Nikotinamidkonzentrationen im Kulturmedium führen ausschließlich zu einem Anstieg der zellulären Nikotinamidkonzentration und nicht zu dem erwarteten parallelen Anstieg der zellulären 1-Methylnikotinamidsyntheserate (Johnson, 1980a).

4.2. Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylierung und dem Stoffwechsel von S-Adenosylmethionin in normalen Geweben und Tumoren

Da für die Synthese von 1-Methylnikotinamid S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator benötigt wird und da das dabei entstehende S-Adenosylhomocystein ein potenter Inhibitor vieler Methyltransferasen ist, wurde von Swiatek et al. (1973) und Kerr (1972) postuliert, daß die Methylierung von Niko-

tinamid zum 1-Methylnikotinamid und die Methylierung von Glycin zu Sarkosin in ein komplexes Regulationssystem zur Kontrolle des zellulären Konzentrationsverhältnisses von S-Adenosylmethionin/S-Adenosylhomocystein involviert seien und so die Methylierung von Makromolekülen wie z.B. von t-RNA, DNA oder Proteinen steuern würden (Bernofsky, 1980; Buch et al., 1972; Gross & Wildenauer, 1972; Hoshino et al., 1982a; Kerr, 1972; Oikawa et al., 1980; Utakoji et al., 1979) (s. dazu auch die detaillierten Ausführungen in 1.1., S. 7, und 1.3., S. 19).

In diesem Zusammenhang gibt es eine auffallende Korrelation zwischen der Aktivität der Nikotinamidmethylase (Nikotinamid : S-Adenosylmethionin Methyltransferase) und der Aktivität der Glycinmethylase (Glycin : S-Adenosylmethionin Methyltransferase): Die Rattenleber besitzt eine hohe Glycinmethylase- und Nikotinamidmethylaseaktivität, während andere normale non-hepatische Rattenorgane wie Niere, Milz, Lunge und Herz nur niedrige bzw. kaum meßbare Aktivitäten dieser beiden Methyltransferasen haben (Tab. II, S. 49) (Yanokura & Tsukada, 1982). Rasch proliferierende Tumoren wie das Novikoff Hepatom oder die Ehrlich Ascites Tumorzellen haben ebenfalls niedrige bzw. kaum meßbare Aktivitäten der Nikotinamidmethylase und der Glycinmethylase (Tab. VIII, S. 80) (Kerr, 1972; Yanokura et al., 1983; Yanokura & Tsukada, 1982). Im Verlaufe der durch N-2-Fluorenylacetamid induzierten Hepatokarzinogenese kommt es zu einem progredienten Verlust der Glycinmethylaseaktivität im Tumorgewebe (Yanokura & Tsukada, 1982). In dem in dieser Arbeit untersuchten Spektrum von transplantierbaren Rattenhepatomen und Ascitestumoren wurde ein fortschreitender Verlust der Nikotinamidmethylaseaktivität mit zunehmender Tumormalignität (Tumorstadium) festgestellt (Tab. VIII). Welche physiologische Bedeutung dieser Korrelation der beiden Methyltransferaseaktivitäten in normalen Geweben und Tumoren für die postulierte Funktion der Nikotinamid- und Glycinmethylierung in der Kontrolle der zellulären S-Adenosylmethioninkonzentration und der t-RNA-Methylierung zukommt (Kerr, 1972; Swiatek et al., 1973), bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, da Johnson & Chiang (1981) zeigten, daß es in verschiedenen normalen und virustransformierten kultivierten Rattennierenzelllinien keine Beziehung zwischen der zellulären 1-Methylnikotinamidsyntheserate und dem Konzentrationsverhältnis von S-Adenosylmethionin/S-Adenosylhomocystein gibt.

4.3. Nikotinamidmethylierung und hepatozelluläre Proliferation: Korrelation zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der Wachstums- bzw. DNA-Syntheserate in der Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung, in RLC-Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen sowie in einem Spektrum von Rattenhepatomen und Ascitestumoren

Außer der Eliminationsfunktion der Nikotinamidmethylierung für exzessives diätetisches Nikotinamid (s. 1.3., S. 19, und 4.1., S. 101) und der Kontrollfunktion im S-Adenosylmethioninstoffwechsel (s. 1.3. und 4.1.) wird eine direkte Involvierung der Nikotinamidmethylierung in die Regulation hepatozellulärer Proliferationsprozesse diskutiert (Hoshino et al., 1982a, 1982b, 1984) (s. dazu auch die detaillierten Ausführungen in 1.3.). In der proliferierenden Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung gibt es eine umgekehrte Korrelation zwischen der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität und der hepatozellulären Proliferationsgeschwindigkeit bzw. DNA-Syntheserate. Die fetale und neonatale Rattenleber haben eine sehr hohe Zellteilungsrate und DNA-Syntheserate; so ist die Thymidininkorporation in die DNA als Maß für die DNA-Syntheseaktivität in der fetalen Rattenleber (17. Schwangerschaftstag, vier Tage vor der Geburt) 30mal höher als in der stationären, nicht proliferierenden erwachsenen Rattenleber (Burch et al., 1963; Ferdinandus et al., 1971; Klemperer & Haynes, 1968; Knox, 1972b; Ove et al., 1970; Sneider & Potter, 1969; Weber, 1977). Gleichzeitig ist die Nikotinamidmethylaseaktivität in der fetalen Leber (18. Schwangerschaftstag, drei Tage vor der Geburt) fast 50mal niedriger als in der erwachsenen Rattenleber (Abb. 5, S. 60). Außerdem zeigen die Gewebeschnittkulturen mit fetaler Rattenleber am 19. Schwangerschaftstag eine 10 - 25mal niedrigere 1-Methylnikotinamidsyntheserate mit 36,5 µM Nikotinamid im Kulturmedium als die Gewebeschnittkulturen mit erwachsener Rattenleber (Tab. VI, S. 63; Abb. 6, S. 65). Während die DNA-Syntheserate der Rattenleber im Verlaufe der normalen Entwicklung allmählich bis auf ganz niedrige Werte in der stationären erwachsenen Rattenleber abnimmt (Ferdinandus et al., 1981; Klemperer & Haynes, 1968; Ove et al., 1970; Sneider & Potter, 1969; Weber, 1979), steigen die Nikotinamidmethylaseaktivität und die 1-Methylnikotinamidsyntheserate entgegengesetzt dazu im Zuge der fetalen und postnatalen Entwicklung in der Rattenleber kontinuierlich an (Abb. 5 und 6; Tab. V, S. 61, Tab. VI).

In den kultivierten RLC-Hepatomzellen gibt es ebenso wie in der sich entwickelnden fetalen und neonatalen Rattenleber eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem Proliferationszustand der Zellen und der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität. In den stationären, nicht proliferierenden RLC-Zellen, die einen konfluierenden Zellrasen gebildet hatten, oder in den RLC-Zellen, die durch Serumdeprivation im Kulturmedium vor Erreichen des stationären Zustandes in der G₁-Phase des Zellzyklus geblockt und an der weiteren Proliferation gehindert wurden, ist die Nikotinamidmethylaseaktivität ungefähr um 70 % höher als in den logarithmisch proliferierenden Zellen (Tab. X, S. 92 ; Tab. XI, S. 95). Außerdem wird in dieser Arbeit dargestellt, daß RLC-Zellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration (36,5 µM) im Kulturmedium aktiv 1-Methylnikotinamid synthetisieren (Abb. 15, S. 98), und daß die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den stationären nicht proliferierenden RLC-Zellen um 50 - 70 % höher als in den logarithmisch proliferierenden Zellen ist (Tab. XII, S. 100).

Diese Befunde implizieren, daß die Nikotinamidmethylierung und deren Produkt, das 1-Methylnikotinamid, in den RLC-Zellen ebenso von physiologischer Bedeutung für die Wachstumsregulation sind wie in der proliferierenden Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung (Abb. 5, S. 60 ; Abb. 6, S. 65; Tab. V, S. 61; Tab. VI, S. 63) und in der rasch proliferierenden Rattenleber nach der mitogen wirkenden Thioacetamidbehandlung bzw. nach der partiellen Hepatektomie (Hoshino et al., 1982a).

Während es in verschiedenen mit Tumurviren transformierten Rattennierenzelllinien, die in der Zellkultur etabliert wurden, keine Beziehung zwischen der Zellproliferationsrate und der 1-Methylnikotinamidsyntheserate der Zellen gibt (Johnson & Chiang, 1981), zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß in einem Spektrum von transplantierbaren Rattenhepatomen und Ascitestumoren mit ganz unterschiedlicher Malignität und Wachstumsrate sowie unterschiedlichem histologischen Differenzierungsgrad mit Ausnahme der sehr langsam proliferierenden Morris minimal deviation Hepatome 9618A und 9121 eine inverse Proportionalität zwischen der Tumorstadiumsgeschwindigkeit bzw. der DNA-Syntheserate und der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität besteht: Undifferenzierte Hepatome wie das Novikoff Hepatom, das Yoshida Ascites Hepatom AH-130, das Zajdela Ascites Hepatom und die anaplastischen non-hepatischen Ascitestumoren (Ehrlich Ascites Tumorzellen, Sarkom 180 Zellen und Yoshida As-

cites Sarkomzellen) haben sehr kurze Transplantationsintervalle (Tab. VIII, S. 80) und sehr hohe DNA-Synthesraten; beispielsweise ist die Thymidininkorporation in die DNA im Novikoff Hepatom rund 40mal höher als in der stationären erwachsenen Rattenleber (Burk et al., 1967; Lawson et al., 1975, 1977; Löhrike & Hesse, 1980, 1981; Perin et al., 1978; Yoshida, 1957, 1971). Gleichzeitig haben das Novikoff Hepatom und das Yoshida Ascites Hepatom AH-130 eine um mehr als das 6-fache niedrigere Nikotinamidmethylaseaktivität als die normale Rattenleber. Die anderen sehr rasch proliferierenden Asciteshepatomzellen und non-hepatischen Ascitestumoren haben eine kaum meßbare Nikotinamidmethylaseaktivität (Tab. VIII). In Relation zu diesen Tumoren wächst das Morris Hepatom 5123tc vergleichsweise langsam (Tab. VIII) und hat eine niedrige DNA-Syntheserate als die sehr rasch proliferierenden Hepatome; diese ist aber dennoch noch ungefähr zehnmal größer als diejenige der normalen erwachsenen Rattenleber (Baril et al., 1973; Elford et al., 1970; Ferdinandus et al., 1971; Morris, 1965; Morris & Chris, 1977a, 1977b; Morris & Slaughter, 1979; Morris & Wagner, 1968; Ove et al., 1969; Sneider et al., 1969; Sweeney et al., 1967; Weber, 1977). Die cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität des Morris Hepatom 5123tc ist um ein Mehrfaches höher als die der sehr rasch proliferierenden Hepatome und vergleichbar mit derjenigen der normalen Rattenleber (Tab. VIII). Während das Tumortransplantationsintervall als Maß für die Tumorstadiumsrate von dem mäßig schnell proliferierenden Morris Hepatom 5123tc über die Morris Hepatome 7777 und 3924 und über das Novikoff Hepatom bis zu den äußerst rasch proliferierenden und undifferenzierten Asciteshepatomen und non-hepatischen Ascitestumoren kontinuierlich abnimmt (Tab. VIII) und die DNA-Syntheseaktivität in der Reihenfolge dieser Tumoren progredient zunimmt (Baril et al., 1973; Burk et al., 1967; Elford et al., 1970; Ferdinandus et al., 1971; Knox, 1972a; Lawson et al., 1975, 1977; Löhrike & Hesse, 1980, 1981; Morris, 1965; Morris & Chris, 1977a, 1977b; Morris & Slaughter, 1979; Morris & Wagner, 1968; Novikoff, 1957; Ove et al., 1969; Perin et al., 1978; Sneider et al., 1969; Sweeney et al., 1967; Weber, 1977; Yoshida, 1957, 1971), nimmt die Nikotinamidmethylaseaktivität umgekehrt bis zum praktisch völligen Defekt in den anaplastischen Ascitestumoren ab (Tab. VIII).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß es sowohl in der fetalen und neonatalen Rattenleber während der Entwicklung (Abb. 5, S. 60; Abb. 6, S. 65; Tab. V, S. 61; Tab. VI, S. 63) als auch in den transplantierbaren Rattenhepatomen sowie Ascitestumoren (Tab. VIII) und in den logarithmisch proliferierenden

RLC-Zellen (Tab. X, S. 92; Tab. XI, S. 95; Tab. XII, S. 100) eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem Proliferationszustand der Zellen und der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität gibt. Diese Resultate scheinen in Kontrast zu den Ergebnissen von Hoshino et al. (1982a) zu stehen: In der regenerierenden Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie und in der proliferierenden Rattenleber nach der Thioacetamidbehandlung korreliert eine hohe Nikotinamidmethylaseaktivität mit einer hohen hepatozellulären Proliferations- und DNA-Syntheseaktivität, die von einem Absinken der NAD-Konzentration in der Leber um 50 % begleitet wird. Hingegen wird in der proliferierenden Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung ein 50-facher Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität von einem Anstieg der hepatischen NAD-Konzentration um 20 % begleitet (Abb. 7, S. 67).

Es bleibt daher zunächst ungewiß, ob 1-Methylnikotinamid die Proliferation der fetalen und neonatalen Rattenleber, von kultivierten RLC-Hepatomen und transplantierbaren Hepatomen mit einer hohen Wachstumsrate tatsächlich über seinen ATP-sparenden Effekt, der durch eine Inhibition der NAD-Synthese durch das 1-Methylnikotinamid vermittelt werden soll, stimulieren kann (Hoshino et al., 1984) (s. dazu auch die detaillierten Ausführungen in 1.3., S. 19). Träfe dieser Mechanismus einer proliferationsstimulierenden Wirkung von 1-Methylnikotinamid in der rasch proliferierenden fetalen und neonatalen Rattenleber, in den Rattenhepatomen mit einer hohen Wachstumsrate und in den logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen zu, dann sollte man erwarten, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in diesen Zellen hepatischer Abstammung ebenso wie in der proliferierenden Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie oder Thioacetamidbehandlung gegenüber den stationären nicht proliferierenden Hepatocyten erhöht wäre. Da die Enzymaktivität in den in dieser Arbeit analysierten normalen und neoplastischen Zellen hepatischer Abstammung und kultivierten RLC-Hepatomen mit einer hohen Proliferationsrate jedoch genau entgegengesetzt zu dieser Annahme deutlich niedriger ist als in den stationären Rattenleberzellen, deuten diese Resultate auf eine sehr komplexe Interaktion zwischen der Nikotinamidmethylierung, dem 1-Methylnikotinamid und der hepatozellulären Wachstumsregulation, zu deren Aufklärung weitere experimentelle Untersuchungen durchgeführt werden müssen.

Grundsätzlich muß außerdem bei dem hier angestellten Vergleich verschiedener hepatozellulärer Versuchsmodelle unterschiedlicher Herkunft und Wachstums-

rate einschränkend berücksichtigt werden, daß die Wachstumsbedingungen und die Messung der zellulären Proliferationsrate in den fetalen und neonatalen Rattenhepatocyten, in den Hepatocyten nach der partiellen Hepatektomie bzw. nach Thioacetamidbehandlung, in den diversen Rattenhepatomen sowie in den kultivierten RLC-Zellen differieren. Dies muß beim direkten Vergleich dieser Versuchsmodelle stets relativierend in Betracht gezogen werden, um verallgemeinernde Fehlinterpretationen über die Wachstumsphasenabhängigkeit der Nikotinamidmethylierung zu vermeiden. Es wurde bereits in 1.2. (S. 14) und in 1.3. (S. 19) anhand zahlreicher Beispiele aus der Literatur gezeigt, daß die Änderungen bestimmter Parameter des Nikotinamidstoffwechsels (i.e. zelluläre NAD-Konzentration, ADP-Ribosyltransferaseaktivität, 1-Methylnikotinamidsyntheserate) in Korrelation zum Proliferationszustand der Zellen bei verschiedenen Versuchssystemen geradezu gegensätzlich sein können, so daß allgemeingültige Regeln oder Beziehungen kaum festgestellt werden können. Es besteht jedoch durchaus die berechtigte Hoffnung, daß die zur Zeit noch vorhandenen Widersprüche und Unklarheiten über die Veränderung des Nikotinamidstoffwechsels in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der Zellen gelöst werden können, sobald genauere und empfindlichere Versuchssysteme als die zur Zeit verfügbaren entwickelt sein werden.

4.4. Biochemische Funktion und Bedeutung der sich während der fetalen und postnatalen Entwicklung verändernden Nikotinamidmethylaseaktivität verschiedener Organe im Nikotinamidstoffwechsel

Im Gegensatz zur regenerierenden Leber, den transplantierbaren Rattenhepatomen und den kultivierten RLC-Zellen laufen in der fetalen und neonatalen Leber parallel zur hepatozellulären Proliferation zusätzlich biochemische Differenzierungsprozesse ab, durch die die fetale und neonatale Leber die für die adulte Leber charakteristischen und sehr universellen Stoffwechselfunktionen erwerben (Knox, 1972b). Die fetale und neonatale Leber sind im Vergleich zur adulten Leber noch sehr wenig differenziert und "biochemisch unreif". Der fetalen Leber fehlen viele der in der erwachsenen, ausdifferenzierten Leber vorhandenen Enzymaktivitäten. Diese physiologische temporäre Enzyminsuffizienz der fetalen Leber betrifft Fermente aus verschiedenen Stoffwechselbereichen, wie z.B. die Xanthinoxidase (Burch et al., 1958), die UDP-Glucuronyltransferase (Brown & Zuelzer, 1958), die Tryptophanperoxidase, die Tyrosinaminotransferase (Auerbach & Waisman, 1958; Knox, 1972b; Nemeth, 1959) und andere

Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel (Knox, 1972b). Im Verlaufe der frühen Postnatalperiode kommt es jedoch rasch zu einem Anstieg dieser Enzymaktivitäten auf die für die adulte Leber typischen Werte im Sinne einer Reifung oder Ausdifferenzierung.

Abgesehen von der bereits in 4.3. (S. 110) diskutierten möglichen Involvierung der Nikotinamidmethylierung in die Regulation der hepatozellulären Proliferation könnte es sich bei dem sehr starken Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität während der späten fetalen und frühen postnatalen Entwicklung der Ratte (Abb. 5, S. 60; Tab. V, S. 61) ebenfalls um einen adaptiven Maturationsprozeß handeln. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität der fetalen Rattenleber 50mal niedriger (Feten drei Tage vor der Geburt) bzw. viermal niedriger (Feten einen Tag vor der Geburt) als die der adulten Rattenleber ist (Abb. 5). Andererseits ist bekannt, daß die Ausscheidung von 1-Methylnikotinamid im Urin bei der Ratte während der gesamten Schwangerschaftsdauer gegenüber dem nichtschwangeren Zustand bis auf das Doppelte erhöht ist (Lojkin et al., 1952). Da es unwahrscheinlich ist, daß die Feten mit ihrer sehr niedrigen hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität und geringen 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Hepatocyten dermaßen große Mengen 1-Methylnikotinamid produzieren (Abb. 5, S. 60; Abb. 6, S. 65; Tab. V, S. 61; Tab. VI, S. 63) und somit für den Anstieg der 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin der schwangeren Mutter verantwortlich sind, sollte dies die Folge einer gesteigerten Nikotinamidmethylierungsrate in der materalen Leber sein, von der angenommen wird, daß sie den während der Schwangerschaft gesteigerten Nikotinamidbedarf für die wachsenden Feten reflektiere (Barlow et al., 1977; Forth et al., 1983; Lojkin et al., 1952).

Da die hepatische Nikotinamidmethylierung andererseits auch eine wichtige Regulationsfunktion in der Aufrechterhaltung der optimalen humoralen und zellulären Nikotinamidkonzentration spielen soll, wäre es daher durchaus denkbar, daß die materne Leber während der Schwangerschaft diese für das ungestörte fetale Wachstum wichtige homöostatische Funktion (Greengard et al., 1966) für die Feten weitgehend übernimmt, weil die fetale Leber mit ihrer physiologischerweise sehr geringen Nikotinamidmethylierungskapazität noch insuffizient für die adäquate Bewältigung dieser bedeutsamen regulatorischen Aufgabe ist. In der postnatalen Entwicklungsphase ist dann jedoch die gleichmäßige Versorgung des Neugeborenen mit Nikotinamid und die Pufferfunktion gegenüber

unphysiologisch hohen bzw. niedrigen Nikotinamidserumkonzentrationen durch die mütterliche Leber nicht mehr gewährleistet, obwohl das Wachstum von kultivierten Zellen, proliferierenden Geweben und jungen Ratten sowohl durch Nikotinamidmangel (Bernofsky, 1980; Eagle, 1956; Gardner et al., 1972; Greengard et al., 1966; Hillyard et al., 1973; Kating & Drephal, 1974; Krehl et al., 1945a, 1945b; Patterson & Harper, 1982b; Salmon, 1947a, 1947b) als auch im besonderen Maße durch unphysiologisch hohe Nikotinamidkonzentrationen schwerwiegend beeinträchtigt wird (Colyer et al., 1973; Ferris & Clark, 1971, 1972; Handler & Dann, 1942; Hoshino et al., 1982a, 1982b; Oide, 1958; Patterson & Harper, 1982b; Revel & Mandel, 1962; Rochette-Egly et al., 1980; Streffler & Scholz, 1972) (s. dazu auch die detaillierten Ausführungen in 1.1., S. 7, und 1.3., S. 19).

Das Neugeborene muß sich deshalb postnatal an das in der Nahrung und insbesondere auch in der Muttermilch ganz beträchtlich schwankende Nikotinamidangebot adaptieren, zumal die Nikotinamidkonzentration in der Muttermilch auch in großen Maße von der nutritiven Nikotinamidkonsumption der laktierenden Mutter abhängt (Kating & Drephal, 1974; Neuweiler, 1944). Ferner ist bekannt, daß junge wachsende Ratten (Alter 3 - 4 Wochen), die mit physiologischen Nikotinamiddosen gefüttert werden, rund 60 - 70 % des nutritiv zugeführten Nikotinamid als 1-Methylnikotinamid wieder ausscheiden und nur den geringeren Anteil des zugeführten Nikotinamid für das Wachstum retinieren (Patterson & Harper, 1982b). Somit könnte der beinahe 50-fache Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität in der Rattenleber während der späten fetalen und frühen postnatalen Entwicklungsphase als ein homöostatischer Adaptionsprozeß an das fluktuierende nutritive Nikotinamidangebot interpretiert werden, der neben möglichen anderen Regulationsmechanismen die für das Wachstum des Organismus optimale systemische und zelluläre Nikotinamidkonzentration garantieren und den Organismus vor der durch einen diätetischen Nikotinamidexzess hervorgerufenen Wachstumsinhibition schützen soll. Zur Verifizierung oder Falsifizierung dieser Hypothese werden jedoch noch weitere Untersuchungen angestellt werden müssen.

Ferner wird zu analysieren sein, über welchen molekularbiologischen Kontrollmechanismus es zu der raschen Aktivierung des Gens für die hepatische Nikotinamidmethylase während der späten fetalen und frühen postnatalen Rattenentwicklung kommt, welche man auch als einen hepatozellulären Differenzierungsprozeß deuten kann. Möglicherweise könnte dabei eine Induktion der Nikotin-

amidmethylase durch einen hormonellen Steuerungsprozeß eine Rolle spielen, da bekannt ist, daß durch eine Hydrocortisonbehandlung ein Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität um 100 % induziert werden kann (Gholson, 1968). Außerdem unterliegt die Urinausscheidung von 1-Methylnikotinamid unterschiedlichen Veränderungen bei verschiedenartigen hormonellen Zuständen wie Insulinmangel (Sanada & Miyazaki, 1980), Hypophysektomie (Gholson, 1968; Greengard et al., 1967), Somatotropinbehandlung (Sanada & Miyazaki, 1980) oder Sexualhormonbehandlung (Lojkin, 1956).

Kontrastierend zu dem sehr ausgeprägten und raschen Anstieg der Nikotinamidmethylaseaktivität in der Rattenleber während der fetalen und frühen postnatalen Entwicklung (Abb. 5, S.60) wurde in der Mausleber praktisch kein Anstieg der Enzymaktivität festgestellt (Tab. VII, S. 70). Dieser auffallend deutliche Unterschied bestätigt die bei den Lebern der erwachsenen Ratte und Maus erhobenen Befunde und deutet ebenso wie die bereits in 4.1. (S. 101) diskutierten Ergebnisse darauf hin, daß die Nikotinamidmethylierung in der Maus offenbar ein Prozeß von nur geringer physiologischer Relevanz im NAD-Stoffwechsel ist, insbesondere was die Eliminationsfunktion der Nikotinamidmethylierung für exzessives Nikotinamid anbelangt (Bonavita et al., 1961; Chaykin et al., 1965; Collins & Chaykin, 1971; Kating & Drephal, 1974; Leifer et al., 1951).

Außerdem gibt es in der fetalen und neonatalen Mausleber im Gegensatz zur Rattenleber keine Korrelation zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der Proliferations- bzw. DNA-Syntheserate. Diese Resultate machen es unwahrscheinlich, daß die Nikotinamidmethylierung in der Mausleber eine Rolle bei der Regulation hepatozellulärer Proliferationsvorgänge spielt, wie sie für die Hepatocyten der Ratte diskutiert wird.

Es fällt auf, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in der Rattenniere und im Rattengehirn im Gegensatz zur Rattenleber während der fetalen und postnatalen Entwicklung nahezu unverändert und sehr niedrig bleibt (Abb. 5, Tab. V, S.61). Diese Ergebnisse müssen als ein weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß die Leber als Ort für die Nikotinamidmethylierung die größte physiologische Bedeutung in der Ratte hat. Welche Funktion die Nikotinamidmethylierung im Nikotinamidstoffwechsel, in der Kontrolle der Wachstumsregulation und in der Zelldifferenzierung dieser non-hepatischen Gewebe hat, bleibt noch offen, da

in der Niere und im Gehirn der Ratte während der fetalen und postnatalen Entwicklung keine bedeutsame Beziehung zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität bzw. der 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Gewebeschnittkulturen, der Wachstumsrate und der NAD-Konzentration bestehen (Abb. 5, S. 60 ; Abb. 6, S. 65; Abb. 7, S. 67; Tab. V, S. 61; Tab. VI, S. 63).

4.5. Pathobiochemische Bedeutung der veränderten Nikotinamidmethylierung in Rattenhepatomen und Ascitestumorzellen unterschiedlicher Malignität sowie in den Lebern der tumortragenden Tiere in Nikotinamidstoffwechsel

Es wurde bereits ausführlich in 4.3. (S. 110) dargestellt, daß es in einem Spektrum von Rattenhepatomen und anaplastischen non-hepatischen Ascitestumoren mit gewissen Ausnahmen eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Tumorstadiumsrate und der Nikotinamidmethylaseaktivität gibt. Eine Zunahme der Tumorstadiumsrate und der Tumormalignität ist durch einen fortschreitenden Verlust oder Defekt der Nikotinamidmethylaseaktivität charakterisiert. Allerdings wurde von Clark et al. (1975) berichtet, daß das ebenfalls sehr rasch proliferierende und wenig differenzierte Walker 256 Karzinosarkom eine viermal höhere Enzymaktivität als die normale Rattenleber hat.

Es ist ein interessantes Phänomen, daß die Nikotinamidmethylaseaktivität in allen analysierten transplantierbaren Rattenhepatomen einschließlich der RLC-Zellen, in der Zellkultur etablierten rasch proliferierenden Rattenhepatomzellen, wesentlich niedriger als in der normalen erwachsenen Rattenleber ist (Tab. VIII, S. 80; Tab. X, S. 92 ; Tab. XI, S. 95) und somit der Enzymaktivität der normalen fetalen und neonatalen Rattenleber gleicht (Abb. 5, S. 60). Eine Ausnahme bildet lediglich das Morris Hepatom 5123tc, dessen Enzymaktivität derjenigen der erwachsenen Rattenleber entspricht (Tab. VIII). Die Hypothese, daß zwischen der normalen fetalen Rattenleber und Rattenhepatomzellen gewisse biochemische Ähnlichkeiten bestünden, wurde zuerst von Greenstein (1942) aufgestellt und anschließend für zahlreiche biochemische Parameter dokumentiert (Knox, 1972a, 1972c, 1972d; Maugh & Marx, 1979). Diese Hypothese impliziert, daß die Rattenhepatomzellen genauso wie die fetalen und neonatalen Rattenhepatocyten in bezug auf die Nikotinamidmethylaseaktivität in einem graduell abgestuften Maße undifferenzierter als die reifen und ausdifferenzierten Hepatocyten sind, denn eine hohe cytosolische Nikotinamidmethylaseaktivität ist eine ausschließlich für die normale erwachsene Rattenleber cha-

rakteristische und sehr spezifische Eigenschaft (Tab. II, S. 49; Abb. 5, S. 60; Tab. VIII, S. 80). Die Regression der Rattenhepatomzellen auf einen primitiveren und undifferenzierten biochemischen Organisations- und Funktionszustand, der durch einen Verlust spezifischer Eigenschaften und Leistungen der erwachsenen Leber sowie durch das Wiederauftreten von Eigenschaften der fetalen Leber gekennzeichnet ist, bezeichnet man deshalb als "Fetalismus der Hepatome" (Knox, 1972c). Da angenommen wird, daß die Nikotinamidmethylierung eine wichtige Funktion in der Kontrolle der zellulären und humoralen Nikotinamidkonzentration spielt (Bernofsky, 1980; Dietrich, 1971; Gholson, 1980), könnte die pathobiochemische Bedeutung der reduzierten Nikotinamidmethylaseaktivität in den Rattenhepatomzellen darin liegen, daß der Regulationsmechanismus der zellulären Synthese von 1-Methylnikotinamid in den Hepatomzellen schwerwiegend beeinträchtigt ist und zu konsekutiven Störungen der zellulären Nikotinamidhomöostase und Wachstumsregulation führt, die vermutlich unter der Kontrolle von 1-Methylnikotinamid steht (Hoshino et al., 1982a, 1982b, 1984).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß die 1-Methylnikotinamidsyntheserate in den mittelschnell proliferierenden Morris Hepatomen 5123tc, 7777 und 3924 sowie in dem rasch proliferierenden Novikoff Hepatom und Yoshida Ascites Hepatom AH-130 wesentlich höher ist, als es nach den Resultaten für die Bestimmung der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität erwartet worden wäre (Tab. VIII, S. 80; Tab. IX, S. 86).

Die möglichen Ursachen für Abweichungen der Nikotinamidmethylaseaktivität von der 1-Methylnikotinamidsyntheserate der lebenden Zellen sind bereits in 4.1. (S. 101) diskutiert worden und gelten auch für die Experimente mit den Rattenhepatomen. Jedoch wurden in den metabolischen Inkorporationsexperimenten mit den normalen Organen (mit Ausnahme der fetalen und neonatalen Rattenniere) keine derart großen Diskrepanzen zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate wie mit den Morris Hepatomen 5123tc, 7777 und 3924, dem Yoshida Ascites Hepatom-AH 130 und dem Novikoff Hepatom registriert. Es sollen daher einige Faktoren diskutiert werden, die für die auffallend hohe 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in diesen Rattenhepatomen verantwortlich sein könnten.

Alle in dieser Arbeit analysierten Rattenhepatome mit Ausnahme der Zajdela Hepatomzellen zeigen eine im Vergleich zur normalen Rattenleber um das 2 - 3-fache erhöhte zelluläre Aufnahme von [^{14}C]Nikotinamid aus dem Kulturmedium in die Hepatomzellen (Tab. IX, S. 86). Es ist bekannt, daß in Tumorzellen die Zellmembranpermeabilität für eine Anzahl von verschiedenen Substanzen verändert ist gegenüber der normalen Zellmembran; beispielsweise ist die Glucosetransportrate und die intrazelluläre Glucosekonzentration in Fibroblasten von Hühnerembryonen, die durch das Rous-Sarkom-Virus transformiert wurden, um das 3 - 5-fache gegenüber den normal proliferierenden Zellen gesteigert (Buddecke, 1978; Maugh & Marx, 1979; Löffler et al., 1979j). Es müßte daher unbedingt untersucht werden, inwieweit Hepatomzellen Nikotinamid gegenüber dem umgebenden Kulturmedium (oder in vivo dem Blutserum) aktiv anreichern, und über welchen Transportmechanismus Nikotinamid in die Tumorzellen gelangt, da die physiologischerweise vorherrschenden intrazellulären Nikotinamidkonzentrationen geschwindigkeitsbestimmend für die zelluläre Syntheserate von 1-Methylnikotinamid sein können, wie bereits in 4.1. (S. 101) erläutert wurde.

Es sind bisher nur wenige Arbeiten publiziert worden, in denen über die intrazelluläre Nikotinamidkonzentration in Tumoren berichtet wurde. In Ehrlich Ascites Tumorzellen beträgt die Nikotinamidkonzentration 6 nmol/g Gewebefrischgewicht (Märki & Greengard, 1966), im Walker 256 Karzinosarkom 7 nmol/g Gewebefrischgewicht (Clark et al., 1975a) und ist somit niedriger als in verschiedenen normalen Geweben, in denen die Nikotinamidkonzentration in einem Bereich von 30 - 100 nmol/g Gewebefrischgewicht liegt (Clark et al., 1975a; Gerber & Deroo, 1970). Andererseits hat man in verschiedenen kultivierten Rattennierenzellen keine Unterschiede in der zellulären Nikotinamidkonzentration zwischen den normalen und den mit Tumoviren transformierten Zellen festgestellt (Johnson & Chiang, 1981).

In verschiedenen Arten von Tumorzellen wurden Veränderungen im Stoffwechsel des S-Adenosylmethionin beschrieben, das als Methylendonator für die Synthese von 1-Methylnikotinamid fungiert und somit ebenfalls die zelluläre Syntheserate von 1-Methylnikotinamid beeinflussen kann (s. dazu auch die Ausführungen in 4.1., S. 101). Bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie ist die Konzentration von S-Adenosylmethionin in den Leukämiezellen ungefähr viermal höher als in normalen Leukocyten (Baldessarini & Carbone, 1965). Mit der

Remission des leukämischen Schubes nimmt die Konzentration von S-Adenosylmethionin in den Leukämiezellen wieder ab (Baldessarini & Bell, 1966). In verschiedenen transplantierbaren non-hepatischen Tumoren ist die S-Adenosylmethioninkonzentration vergleichbar mit der in der normalen Leber (70 - 120 nmol/g Gewebefrischgewicht) und normalen non-hepatischen Gewebe wie Milz, Niere, Nebenniere, Pancreas und Gehirn (45 - 90 nmol/g Gewebefrischgewicht) oder sogar etwas höher (Hoffman et al., 1980; Lombardini & Talalay, 1973). Die Konzentration von S-Adenosylmethionin im Walker 256 Karzinosarkom beträgt 150 nmol/g Gewebefrischgewicht, im Lewis Lungenkarzinom 100 nmol/g Gewebefrischgewicht und in L1210 Mausleukämiezellen 90 nmol/g Gewebefrischgewicht (Lombardini & Talalay, 1973). In verschiedenen kultivierten Rattenierenzelllinien gibt es keine Unterschiede in der Konzentration von S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein zwischen den normalen und den mit Tumoviren transformierten Zellen (Johnson & Chiang, 1981). Ob die S-Adenosylmethioninkonzentration in den Rattenhepatomzellen gegenüber normalen Hepatocyten erhöht ist, ist nicht bekannt. Unter Berücksichtigung der Ausführungen in 4.1. (S. 101) wäre es jedoch vorstellbar, daß eine im Vergleich zum normalen Hepatocyten erhöhte S-Adenosylmethioninkonzentration in den Rattenhepatomzellen zu einer höheren Syntheserate von 1-Methylnikotinamid in den lebenden Hepatomzellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium führen könnte, als es nach den Ergebnissen für die Bestimmung der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität in diesen Tumoren erwartet worden wäre.

Während der Hepatokarzinogenese und in transplantierbaren Rattenhepatomen werden Veränderungen im Isoenzymmuster der S-Adenosylmethionin-Synthetase (ATP:L-Methionin S-Adosyltransferase, E.C. 2.5.1.6.), die die Biosynthese von S-Adenosylmethionin katalysiert, beobachtet: Es gibt zwei verschiedene Isoenzyme der S-Adenosylmethioninsynthetase in der normalen Leber, das α - und das β -Isoenzym; ein drittes Isoenzym, das γ -Isoenzym, kommt dagegen ausschließlich in non-hepatischen Geweben vor (Liau et al., 1979; Okada et al., 1981; Yanokura et al., 1983). Diese drei Isoenzyme unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht und in ihren K_m -Werten für ATP und L-Methionin (Okada et al., 1981; Liau et al., 1979). Während der durch N-2-Fluorenylacetamid induzierten Hepatokarzinogenese kommt es zu einem progredienten Verlust der leberspezifischen α - und β -Isoenzyme der S-Adenosylmethioninsynthetase,

während gleichzeitig das non-hepatische γ -Isoenzym auftritt (Tsukada & Okada, 1980). In dem gut differenzierten Morris Hepatom 7316A, dem Novikoff Hepatom und dem Yoshida Ascites Hepatom AH-130 wurde ausschließlich das non-hepatische γ -Isoenzym der S-Adenosylmethioninsynthetase nachgewiesen (Liau et al., 1977, 1979; Okada et al., 1979, 1980). Ob diese Veränderungen im Isoenzymmuster der S-Adenosylmethioninsynthetase zu einer erhöhten S-Adenosylmethioninkonzentration in den Hepatomen führen könnten und somit eine mögliche Ursache für die erhöhte zelluläre 1-Methylnikotinamidsyntheserate in diesen Hepatomen darstellten, bedarf weiterer Untersuchungen.

Es wird nunmehr deutlich, daß zusätzlich zu den bereits in 4.1. (S. 101) diskutierten Faktoren in den Morris Hepatomen und undifferenzierten Hepatomen einer Reihe weiterer in ihrer tatsächlichen Bedeutung zur Zeit schwer einzuschätzende Faktoren wirksam sein könnten, die in der Lage wären, die Syntheserate von 1-Methylnikotinamid in den Hepatomzellen mit einer physiologischen Nikotinamidkonzentration im Kulturmedium zu beeinflussen, und somit eine Erklärung für die beobachteten Diskrepanzen zwischen der Nikotinamidmethylaseaktivität und der in Relation dazu sehr hohen 1-Methylnikotinamidinkorporationsrate in bestimmten Hepatomen geben könnten. Die hier gezeigten widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse könnte man als Ausdruck der Tatsache interpretieren, daß der normale Regulationsmechanismus der zellulären 1-Methylnikotinamidsynthese in den hier untersuchten Hepatomen elementar gestört ist. Ob diese Regulationsstörung für das autonome Tumorwachstum mitverantwortlich ist, oder ob es sich dabei lediglich um ein sekundäres Epiphänomen als Folge gestörter Genfunktionen handelt, muß zum gegenwärtigen Zeitpunkt offen bleiben.

Außerdem war bei den metabolischen Inkorporationsexperimenten mit Ehrlich Ascites Tumorzellen, Sarkom 180 Zellen, Yoshida Ascites Sarkomzellen sowie Zajdela Ascites Hepatomzellen auffallend, daß diese anaplastischen Tumorzellen zwar nur eine äußerst niedrige [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate, aber im Kontrast dazu eine sehr hohe [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate mit 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium aufweisen (Tab. IX, S. 86; Abb. 8; S. 73; Abb. 12, S. 88). Andererseits zeigt Abb. 9 (S. 75) eindrücklich, daß es in Ehrlich Ascites Tumorzellen, Sarkom 180 Zellen und Yoshida Ascites Sarkomzellen zu einem nur geringen Anstieg der zellulären NAD-Konzentration kommt, wenn diese Zellen mit steigenden Nikotinamidkonzentrationen sowohl im physiologischen

als auch im pharmakologischen Konzentrationsbereich von 40 μM - 5 mM inkubiert werden. Hingegen führen pharmakologische Nikotinamiddosen bzw. Konzentrationen beispielsweise in der Leber und Niere von Ratte und Maus, in RLC-Hepatoma-Zellen sowie in anderen transplantierbaren Tumoren (L 1210 Mausleukämiezellen, Sarkom 37, Bashford-E63 Karzinom) zu einem Anstieg der NAD-Konzentration um ein Mehrfaches des Ausgangswertes (Blake et al., 1967; Blake & Kun, 1971; Clark & Pinder, 1969; Hoshino et al., 1982b, 1984; Kaplan et al., 1956; Threlfall, 1969).

Zur möglichen Erklärung dieser Beobachtungen bei bestimmten transplantierbaren Ascitestumoren sollen zwei Hypothesen kurz genannt werden, ohne daß eigene Untersuchungen angestellt worden wären, um diese sehr komplexe Problematik weiter zu analysieren, da diese das eigentliche Thema der Arbeit nur am Rande berührt:

Es ist in der Literatur gut dokumentiert, daß verschiedene Ascitestumorzellen wie z.B. Zajdela Ascites Hepatomzellen und Ehrlich Ascites Tumorzellen NAD als Substrat für die Synthese von Poly-(ADP-Ribose) nutzen (Bredehorst et al., 1979; Hilz & Stone, 1976; Holtlund et al., 1981; Stone et al., 1976). Es wurde bereits in 1.2. (S. 14) referiert, daß die Molekülhalbwertzeit von NAD sehr niedrig ist (Olivera & Ferro, 1982) und daß die nukleäre Synthese von Poly-(ADP-Ribose) eine Ursache für den raschen zellulären NAD-Turnover darstellt (Olivera & Ferro, 1982; Rechsteiner et al., 1986). Daher wäre es theoretisch denkbar, daß die hohe [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate bei nur geringfügigem Anstieg der NAD-Konzentration mit steigenden Nikotinamidkonzentrationen im Kulturmedium in diesen Ascitestumorzellen einen Indikator für einen sehr aktiven Pyridinnucleotidzyklus darstellt, in dessen Ablauf es zu einer raschen Inkorporation von [^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD kommt; die zelluläre NAD-Konzentration steigt jedoch nicht meßbar an, da das neu synthetisierte [^{14}C]NAD sofort in den Kreislauf der Synthese und Degradation von Poly-(ADP-Ribose) eingeschleust wird.

Daß diese Erklärungsmöglichkeit zutreffend ist, erscheint nicht sehr wahrscheinlich, denn in anderen Geweben wie z.B. der Leber oder Niere, die eine aktive Poly-(ADP-Ribose)synthese (Nishizuka et al., 1967) und einen aktiven Pyridinnucleotidzyklus mit hohem NAD-Turnover (Collins & Chaykin, 1972; Dietrich, 1971; Dietrich et al., 1965, 1966, 1968b; Greenbaum & Pinder, 1968; Keller et

al., 1971; Petrack et al., 1966) aufweisen, nimmt die NAD-Syntheserate in Abhängigkeit von der Nikotinamidkonzentration zu, und es stellt sich ein neues Fließgleichgewicht zwischen NAD-Synthese und NAD-Degradation ein. Dieses führt dazu, daß die zelluläre NAD-Konzentration sehr deutlich ansteigt (Blake et al., 1967; Blake & Kun, 1971; Clark & Pinder, 1969; Hoshino et al., 1982b, 1984; Kaplan et al., 1956; Threlfall, 1959). Da dies jedoch, wie bereits dargestellt wurde, in den untersuchten Ascitestumorzellen nicht der Fall ist, muß davon ausgegangen werden, daß die de novo NAD-Synthesekapazität dieser Zellen tatsächlich nicht sehr groß ist.

Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß die hohe [^{14}C]NAD-Inkorporationsrate in diesen Ascitestumoren über eine durch die NAD-Glycohydrolase katalysierte Austauschreaktion zustande kommt. Es ist seit den Arbeiten von Lamborg et al. (1958) und Zatman et al. (1954) bekannt, daß die NAD-Glycohydrolase nicht nur den hydrolytischen Abbau von NAD zu ADP-Ribose und Nikotinamid katalysiert, sondern darüber hinaus auch Transglycosidaseaktivität besitzt, so daß verschiedene Ribosylakzeptoren auf den ADP-Riboseanteil des NAD transferiert werden können (Reaktion 9 in Abb. 1, S. 8). Narrod et al. (1961) sowie Purko & Stewart (1967) hatten gezeigt, daß es in vivo in der Mausleber und in Ehrlich Ascites Tumorzellen zu einer Inkorporation von [Carbonyl- ^{14}C]Nikotinamid in das [^{14}C]NAD kommt, die zum Teil darauf zurückzuführen ist, daß die NAD-Glycohydrolase den Austausch des gebundenen nicht radioaktiven Nikotinamids des NAD gegen das freie [Carbonyl- ^{14}C]Nikotinamid katalysiert und so zur Radioaktivitätsinkorporation in das [^{14}C]NAD beiträgt. Dieser Austauschmechanismus führt jedoch nicht zu einer de novo NAD-Synthese über den Nikotinamid- oder Nikotinsäureweg. Außerdem ist es gut dokumentiert, daß Ehrlich Ascites Tumorzellen eine hohe NAD-Glycohydrolaseaktivität besitzen und diese auch in den lebenden Zellen aktiv ist (Bock et al., 1968; Green & Bodansky, 1963; Green & Dobriansky, 1967; Purko & Stewart, 1967). Analoges könnte auch für die Sarkom 180 Zellen, Yoshida Ascites Sarkomzellen und Zajdela Ascites Hepatomzellen gelten.

In allen in dieser Arbeit untersuchten Versuchstieren mit soliden Hepatomen, Asciteshepatomen und non-hepatischen Ascitestumoren ist die hepatische Nikotinamidmethylaseaktivität der Tumorträger gegenüber derjenigen der gesunden Kontrolllebern unverändert oder geringfügig erhöht (Tab. VIII, S. 80). Lediglich die Ratten mit dem hochdifferenzierten Morris Hepatom 9618A und dem

mäßig differenzierten Morris Hepatom 5123tc, die eine niedrige : bzw. hohe Tumorenzymaktivität aufweisen, zeigen statistisch hochsignifikant niedrigere Werte der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität (Tab. VIII, S. 80). Clark et al., (1975a) berichteten, daß die Enzymaktivität in der Leber von Ratten mit dem rasch proliferierenden Walker 256 Karzinosarkom, das eine sehr hohe Nikotinamidmethylaseaktivität hat, gegenüber der normalen Kontrolleber unverändert ist, wohingegen Ratten mit dem gleichfalls rasch proliferierenden Rhabdomyoblastom oder Mi-Sarkom eine deutlich niedrigere hepatische 1-Methylnikotinamidsyntheserate aufweisen (Tatarskii, 1955). Diese Resultate zeigen, daß es offenbar keine Beziehung zwischen der Tumormalignität und der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität des Tumorträgers gibt. Vielmehr deuten die nunmehr vorliegenden Ergebnisse darauf hin, daß die hepatische Nikotinamidmethylierung nur bei bestimmten Tumorarten alteriert ist. Es muß daher geklärt werden, welche offensichtlich komplexen Interaktionen in bezug auf die Nikotinamidmethylierung zwischen den Tumorzellen, der Leber des Tumorträgers und dem Gesamtorganismus bestehen, insbesondere über welchen pathobiochemischen Mechanismus es bei gewissen Tumoren zur Verminderung der Nikotinamidmethylaseaktivität in der Leber der tumortragenden Tiere kommt. Ferner muß die Frage untersucht werden, inwieweit die 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin bei Ratten mit transplantierbaren Hepatomen oder Ascitestumoren gegenüber den gesunden Tieren verändert ist. Clark et al. (1975a) berichteten, daß die erhöhte 1-Methylnikotinamidausscheidung im Urin der Tiere mit dem Walker 256-Karzinosarkom wahrscheinlich auf die sehr hohe Nikotinamidmethylierungsrate in diesem Tumor zurückzuführen ist. Welche Faktoren für die verringerte Exkretion von 1-Methylnikotinamid bei den Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen (Abdel Kader et al., 1962; Basu et al., 1973) verantwortlich sind, ist nicht bekannt und bedarf ebenfalls weiterer Forschungsanstrengungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Verteilung der cytosolischen Aktivität der Nikotinamid : S-Adenosylmethionin-Methyltransferase (Nikotinamidmethylase, E.C. 2.1.1.1.) in normalen Organen der Ratte und der Maus und die Veränderungen der Enzymaktivität in Organen während der fetalen und postnatalen Entwicklung, in Rattenhepatomen und Ascitestumoren mit unterschiedlicher Wachstumsrate sowie in Rat Liver Cell (RLC)-Kulturen aus verschiedenen Wachstumsphasen wurden studiert. Ausserdem wurden Gewebeschnitt- und Tumorzellkulturen in vitro mit einer physiologischen [^{14}C]Nikotinamidkonzentration (36,5 μM) inkubiert, um die Syntheserate von 1-Methylnikotinamid in den lebenden Zellen zu messen.

1. Von allen untersuchten Organen hat die Rattenleber die höchste Nikotinamidmethylaseaktivität, während non-hepatische Rattengewebe wie Nebenniere, Pancreas, Niere, Gehirn und Milz sowie Leber, Niere und Gehirn der Maus weniger als 15 % der Rattenleberaktivität aufweisen. Ein ähnliches Verteilungsmuster ergibt sich für die [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate in Gewebeschnittkulturen dieser Organe mit 36,5 μM [^{14}C]Nikotinamid im Kulturmedium.
2. Drei Tage vor der Geburt hat die fetale Rattenleber eine Nikotinamidmethylaseaktivität, die nur 2 % derjenigen der erwachsenen Leber beträgt. Bereits einen Tag vor der Geburt steigt die Enzymaktivität an und erreicht den Wert der erwachsenen Leber am 28. Lebenstag. Der starke Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität während der fetalen und postnatalen Entwicklung der Ratte wird von einem parallelen Anstieg der [^{14}C]1-Methylnikotinamidsyntheserate in den Gewebeschnittkulturen mit fetaler und neonataler Leber begleitet. In der Niere und im Gehirn der Ratte sowie in Leber, Niere und Gehirn der Maus wurde keine Veränderung der Nikotinamidmethylaseaktivität während der fetalen und postnatalen Entwicklung festgestellt.
3. In einem Spektrum von transplantierbaren Rattenhepatomen und non-hepatischen Ascitestumoren mit unterschiedlicher Malignität gibt es eine umgekehrte Korrelation zwischen der Tumorstadiumsrate und der Nikotinamidmethylaseaktivität. Die Enzymaktivität nimmt stufenweise von dem mittelschnell proliferierenden Morris Hepatom 5123tc, das eine der normalen

Rattenleber vergleichbare Enzymaktivität hat, über die Morris Hepatome 7777 und 3924, das Novikoff Hepatom, das Yoshida Ascites Hepatom AH-130 bis zum am schnellsten proliferierenden und undifferenzierten Zajdela Ascites Hepatom ab. Die Zajdela Ascites Hepatomzellen und die anaplastischen non-hepatischen Yoshida Ascites Sarkomzellen, Sarkom 180 Zellen sowie Ehrlich Ascites Tumorzellen haben eine kaum meßbare Nikotinamidmethylaseaktivität. Die außergewöhnlich niedrige Enzymaktivität der langsam proliferierenden Morris minimal deviation Hepatome 9618A und 9121 paßt nicht in diese Regel.

4. Kultivierte RLC-Zellen, etablierte Rattenhepatomzellen in der Zellkultur, zeigen eine Wachstumsphasenabhängigkeit der cytosolischen Nikotinamidmethylaseaktivität. Nicht proliferierende RLC-Zellen aus der stationären Wachstumsphase oder RLC-Zellen, deren Wachstum durch Serumentzug im Kulturmedium vor Erreichen des stationären Zustandes in der G₁-Phase gestoppt wurde, haben eine Nikotinamidmethylaseaktivität, die etwa 50 % derjenigen der normalen erwachsenen Leber beträgt und um rund 70 % höher als in den logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen ist. Außerdem ist die 1-Methylnikotinamidsyntheserate mit 36,5 µM Nikotinamid im Kulturmedium in den stationären RLC-Zellen um 50 % höher als in den Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase.

Die Nikotinamidmethylierung ist hauptsächlich eine Funktion der normalen erwachsenen Rattenleber. Es wird kontrovers diskutiert, ob die Methylierung von Nikotinamid zum 1-Methylnikotinamid in der Rattenleber der Elimination von exzessivem nutritiven Nikotinamid dient und somit eine wichtige Regulationsfunktion in der Aufrechterhaltung der für den Organismus optimalen humoralen und zellulären Nikotinamidkonzentration erfüllt. Die Funktion der Nikotinamidmethylierung in den non-hepatischen Organen ist nicht bekannt. Der starke Anstieg der hepatischen Nikotinamidmethylaseaktivität während der späten fetalen und frühen postnatalen Entwicklung der Ratte könnte als ein regulativ-homöostatischer Prozeß im Sinne einer Zelldifferenzierung interpretiert werden, um einerseits die adäquate Versorgung des Organismus mit Nikotinamid zu garantieren und um andererseits die zytotoxischen und proliferationshemmenden Effekte hyperphysiologischer Nikotinamidkonzentrationen (> 0,1 mM) abzublocken. Der stufenweise Verlust der Nikotinamidmethylaseaktivität in Hepatomen zunehmender Malignität könnte daher Ausdruck des ge-

störten Regulationsmechanismus der zellulären 1-Methylnikotinamidsynthese in den Tumorzellen sein, was zu konsekutiven Alterationen der Nikotinamidhomöostase und des NAD-Stoffwechsels führte.

Hoshino et al. (1982a) hatten gezeigt, daß in der proliferierenden Rattenleber nach der partiellen Hepatektomie oder Thioacetamidbehandlung eine hohe Wachstumsrate bzw. DNA-Syntheserate mit einer hohen Nikotinamidmethylaseaktivität korreliert. In dieser Arbeit hingegen wird demonstriert, daß in der rasch proliferierenden fetalen und neonatalen Rattenleber, in den logarithmisch proliferierenden RLC-Zellen sowie in einem Spektrum von Rattenhepatomen und Ascitestumoren eine hohe Wachstumsrate bzw. DNA-Syntheserate mit einer niedrigen Nikotinamidmethylaseaktivität korreliert. Die Bedeutung dieser Befunde für die vermutete Involvierung der Nikotinamidmethylierung in die Wachstumsregulation von normalen Hepatocyten und Hepatomzellen bedarf weiterer Untersuchungen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel Kader, M.M., Guindy, A. & Mahfouz, M.M. (1962)
Nicotinamide Methochloride Excretion Studies and Blood Coenzymes in Some Cancerous Patients.
Alexandria Medical Journal 8, 1-6
2. Ackerknecht, E.H. (1978)
in: Geschichte der Medizin, 4. Auflage, S. 116
Enke Verlag, Stuttgart
3. Althaus, F.R., Lawrence, S.D., Sattler, G.L. & Pitot, H.C. (1980)
Effects of Nicotinamide on Unscheduled DNA Synthesis in Cultured Hepatocytes.
Biochemical and Biophysical Research Communications 95, 1063-1070
4. Auerbach, V.H. & Waisman, H.A. (1959)
Tryptophan Peroxidase-Oxidase, Histidase and Transaminase Activity in the Liver of the Developing Rat.
Journal of Biological Chemistry 234, 304-306
5. Axelrod, J. & Tomchick, R. (1958)
Enzymatic O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols.
Journal of Biological Chemistry 233, 702-705
6. Baldessarini, R.J. & Bell, W.R. (1966)
Methionine-Activating Enzyme and Catechol-O-Methyl Transferase Activity in Normal and Leukemic White Blood Cells.
Nature 209, 78-79
7. Baldessarini, R.J. & Carbone, P.P. (1965)
Adenosylmethionine Elevation in Leukemic White Blood Cells.
Science 149, 644-645
8. Baldessarini, R.J. & Kopin, I.J. (1963)
Assay of Tissue Level of S-Adenosylmethionine.
Analytical Biochemistry 6, 289-292
9. Baril, E.F., Jenkins, M.D., Brown, O.E. & Morris, H.P. (1973)
DNA Polymerase I and II in Rat Liver and Morris Hepatomas.
Cancer Research 33, 1187-1193

10. Barlow, G.B., Sutton, I.L. & Wilkinson, A.W. (1977)
Metabolism of Nicotinic Acid in Children with Burns and Scalds.
Clinica Chimica Acta 75, 337-342
11. Basu, T.K., Raven, R.W., Bates, C. & Williams, D.C. (1973)
Excretion of S-Hydroxyindole Acetic Acid and N¹-Methylnicotinamide
in Advanced Cancer Patients.
European Journal of Cancer 9, 527-528
12. Bennett, W.M., Elliot, W.C. & Barry, J.M. (1981)
Active Uptake of Para-Amino-Hippurate, N¹-Methylnicotinamide and
Gentamicin by Human Renal Cortex after Prolonged Collins-2 Preservation.
Kidney International 19, 264
13. Berge, K.G. (1961)
Side Effects of Nicotinic Acid in the Treatment of Hypercholesteremia.
Geriatrics 16, 416-422
14. Berger, N.A., Berger, S.J., Sikorski, G.W. & Catino, D.M. (1982)
Amplification of Pyridine Nucleotide Pools in Mitogen-Stimulated
Human Lymphocytes.
Experimental Cell Research 137, 79-88
15. Berger, N.A. & Sikorski, G.W. (1980)
Nicotinamide Stimulates Repair of DNA Damage in Human Lymphocytes.
Biochemical and Biophysical Research Communications 95, 67-72
16. Berger, N.A., Sikorski, G.W. & Petzold, S.J. (1980)
Association of Poly (ADP-Ribose) Synthesis with DNA Strand Breaks
in Replication and Repair.
in: Novel ADP-Ribosylations of Regulatory Enzymes and Proteins
(M.SMULSON & T.SUGIMURA, Eds.), S. 185-194
Elsevier, New York
17. Berndt, W.O. (1978)
Comparison of the Transport of Two Organic Bases, Tetraethylammonium
and N¹-Methylnicotinamide.
Kidney International 14, 737
18. Bernofsky, C., (1979)
New Synthesis of the 4- and 6-Pyridones of 1-Methylnicotinamide and
1-Methylnicotinic Acid (Trigonelline).
Analytical Biochemistry 96, 189-200

19. Bernofsky, C. (1980)
Physiologic Aspects of Pyridine Nucleotide Regulation in Mammals.
Molecular and Cellular Biochemistry 33, 135-143
20. Blake, R.L., Blake, S.L., Loh, H.H. & Kun, E. (1967)
The Effect of Nicotinamide and Homologs on the Activity of Inducible Enzymes and NAD Content of the Rat Liver.
Molecular Pharmacology 3, 412-422
21. Blake, R.L. & Kun, E. (1971)
Methods of Enzyme Induction by Nicotinamide.
Methods in Enzymology 18, 113-123
22. Bock, K.W., Gäng, V., Beer, H.P., Kronau, R. & Grunicke, H. (1968)
Localization and Regulation of Two NAD Nucleosidases in Ehrlich Ascites Cells.
European Journal of Biochemistry 4, 357-363
23. Bonavita, V., Narrod, S.A. & Kaplan, N.O. (1961)
Metabolites of Nicotinamide in Mouse Urine: Effects of Azaserine.
Journal of Biological Chemistry 236, 936-939
24. Borek, E. & Srinivasan, P.R. (1966)
The Methylation of Nucleic Acids.
Annual Review of Biochemistry 35, 275-298
25. Bredehorst, R., Goebel, M., Renzi, F., Kittler, M., Klapproth, K. & Hiltz, H. (1979)
Intrinsic ADP-Ribose Transferase Activity versus Level of Mono(ADP-Ribose) Protein Conjugates in Proliferating Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 360, 1737-1743
26. Bredehorst, R., Wielckens, K., Adamietz, P., Steinhagen-Thiessen, E. & Hiltz, H. (1981)
Mono- and Poly-ADP-Ribosylation of Proteins in Developing Liver and Hepatomas.
European Journal of Biochemistry 120, 267-274
27. Brown, A.K. & Zuelzer, W.W. (1958)
Studies on the Neonatal Development of the Glucoronide Conjugating System.
Journal of Clinical Investigation 37, 332-340

28. Brown, F.C., White, J.B. & Kennedy, J.K. (1960)
 Urinary Excretion of Tryptophan Metabolites by Schizophrenic Individuals.
 American Journal of Psychiatry 117, 63-65
29. Brown, R.R. & Price, J.M. (1956)
 Quantitative Studies on the Metabolites of Tryptophan in the Urine of
 the Dog, Cat, Rat and Man.
 Journal of Biological Chemistry 219, 985-997
30. Brown, R.R., Thornton, M.J. & Price, J.M. (1961)
 The Effect of Vitamin Supplementation on the Urinary Excretion of Tryptophan
 Metabolites by Pregnant Women.
 Journal of Clinical Investigation 40, 617-623
31. Brown, R.R., Vivian, V.M., Reynolds, M.S. & Price, J.M. (1958)
 Some Aspects of Tryptophan Metabolism in Human Subjects:
 II. Urinary Tryptophan Metabolites on a Low Niacin Diet.
 Journal of Nutrition 66, 599-606
32. Buch, L., Streeter, D., Halpern, R.M., Simon, L.N., Stout, M.G. &
 Smith, R.A. (1972)
 Inhibition of Transfer Ribonucleic Acid Methylase Activity from Several
 Human Tumors by Nicotinamide and Nicotinamide Analogs.
 Biochemistry 11, 393-397
33. Buddecke, E. (1978a)
in: Pathobiochemie, 2. Auflage, S. 192
 Walter de Gruyter Verlag, Berlin
34. Buddecke, E. (1978b)
in: Pathobiochemie, 2. Auflage, S. 190-192
 Walter de Gruyter Verlag, Berlin
35. Buddecke, E. (1978c)
in: Pathobiochemie, 2. Auflage, S. 65-67
 Walter de Gruyter Verlag, Berlin
36. Buddecke, E. (1978d)
in: Pathobiochemie, 2. Auflage, S. 361-362
 Walter de Gruyter Verlag, Berlin
37. Buddecke, E. (1980a)
in: Grundriss der Biochemie, 6. Auflage, S. 391-392
 Walter de Gruyter Verlag, Berlin

38. Buddecke, E. (1980b)
in: *Grundriss der Biochemie*, 6. Auflage, S. 466-467
Walter de Gruyter Verlag, Berlin
39. Burch, H.B. & von Dippe, P. (1964)
Pyridine Nucleotides in Developing Rat Liver.
Journal of Biological Chemistry 239, 1898-1899
40. Burch, H.B., Lowry, O.H., de Gubareff, T. & Lowry, S.R. (1958)
Flavin Enzymes in Liver and Kidney of Rats from Birth to Weaning.
Journal of Cellular and Comparative Physiology 52, 503-510
41. Burch, H.B., Lowry, O.H., Kuhlman, A.M., Skerjance, J., Diamant, E.J.,
Lowry, S.R. & von Dippe, P. (1963)
Changes in Patterns of Enzymes of Carbohydrate Metabolism in the Developing Rat Liver.
Journal of Biological Chemistry 238, 2267-2273
42. Burk, D., Woods, M. & Hunter, J. (1967)
On the Significance of Glycolysis for Cancer Growth, with Special Reference to Morris Rat Hepatomas.
Journal of the National Cancer Institute 38, 839-863
43. Burzio, L. & Koide, S.S. (1972)
In vitro Effect of NAD on DNA Synthesis in Isolated Nuclei from Regenerating Rat Liver and Novikoff Hepatoma.
FEBS Letters 20, 29-32
44. Burzio, L., Reich, L. & Koide, S.S. (1975)
Poly (Adenosine Diphosphoribose)synthase Activity of Isolated Nuclei of Normal and Leukemic Leukocytes.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 149, 933-938
45. Caiger, P., Morton, R.K., Filsell, O.H. & Jarret, I.G. (1962)
A Comparative Study of Nicotinamide Nucleotide Coenzymes during Growth of the Sheep and Rat.
Biochemical Journal 85, 351-359
46. Cantoni, G.L. (1951)
Methylation of Nicotinamide with a Soluble Enzyme System from Rat Liver.
Journal of Biological Chemistry 189, 203-216

47. Cantoni, G.L. (1957)
Nicotinamide Methyltransferase.
Methods in Enzymology 2, 257-263
48. Cantoni, G.L. (1975)
Biological Methylation: Selected Aspects.
Annual Review of Biochemistry 44, 435-451
49. Caplan, A.I., Zwillig, E. & Kaplan, N.O. (1968)
3-Acetylpyridine: Effects in vitro Related to Teratogenic Activity in Chicken Embryos.
Science 160, 1009-1010
50. Cazzullo, C.L., Sacchetti, E. & Smeraldi, E. (1976)
N¹-Methylnicotinamide Excretion and Affective Disorders.
Psychological Medicine 6, 265-270
51. Cedrangolo, F. & Scala, E. (1959)
Necessità di associare la metionina all'acido nicotinico e alla nicotinamide, quando si vogliono somministrare alte e altissime dosi di questi composti piridinici.
Minerva Medica 50, 1299
52. Chaloupka, M.M., Williams, J.N., Reynolds, M.S. & Elvehjem, C.A. (1957)
Relative Roles of Niacin and Tryptophan in Maintaining Blood Pyridine Nucleotides, Nitrogen Balance and Growth in Adult Rats.
Journal of Nutrition 63, 361-375
53. Chambon, P., Weill, J.D., Doly, J., Strosser, M.T. & Mandel, P. (1966)
On the Formation of a Novel Adenylic Compound by Enzymatic Extracts of Liver Nuclei.
Biochemical and Biophysical Research Communications 25, 638-643
54. Chang, M.L.W. & Johnson, B.C. (1959)
N-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide, a New Major Normal Metabolite of Nicotinic Acid in Rat Urine.
Journal of Biological Chemistry 234, 1817-1821
55. Chang, M.L.W. & Johnson, B.C. (1961)
N-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide as a Metabolite of Nicotinic Acid in Man and Monkey.
Journal of Biological Chemistry 236, 2096-1098

56. Chaykin, S., Daganí, M., Johnson, L. & Marcqueta, S. (1965)
The Fate of Nicotinamide in the Mouse.
Journal of Biological Chemistry 240, 932-938
57. Christensen, N.A., Achor, R.W.P., Berge, K.G. & Mason, H.L. (1961)
Nicotinic Acid Treatment of Hypercholesteremia.
Journal of the American Medical Association 177, 546-550
58. Chu, B.C.F. & Lawley, P.D. (1973)
Increased Urinary Excretion of Pyrimidine and Nicotinamide Derivates in Rats Treated with Methyl Methanesulphonate.
Chemico-Biological Interactions 7, 64-73
59. Chu, B.C.F. & Lawley, P.D. (1975)
Increased Urinary Excretion of Nucleic Acids and Nicotinamide Derivates by Rats after Treatment with Alkylating Agents.
Chemico-Biological Interactions 10, 333-338
60. Clark, B.R., Murai, J.T., Pomeranz, A., Mills, P.A., Halpern, R.M. & Smith, R.A. (1975a)
Altered Distribution and Excretion of N¹-Methylnicotinamide in Rats with Walker 256 Carcinosarcoma.
Cancer Research 35, 1727-1733
61. Clark, B.R., Halpern, R. & Smith, R.A. (1975b)
A Fluorimetric Method for Quantitation in the Picomole Range of N¹-Methylnicotinamide and Nicotinamide in Serum.
Analytical Biochemistry 68, 54-61
62. Clark, J.B. & Greenbaum, A.L. (1966)
The Concentration and Biosynthesis of Nicotinamide Nucleotides in the Livers of Rats Treated with Carcinogens.
Biochemical Journal 98, 546-556
63. Clark, J.B. & Pinder, S. (1969)
Control of the Steady-State Concentration of the Nicotinamide Nucleotides in Rat Liver.
Biochemical Journal 114, 321-330
64. Claycomb, W.C. (1976)
Poly (Adenosine Diphosphate Ribose) Polymerase Activity and Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Differentiating Cardiac Muscle.
Biochemical Journal 154, 387-393

65. Collins, P.B. & Chaykin, S. (1972)
The Management of Nicotinamide and Nicotinic Acid in the Mouse.
Journal of Biological Chemistry 247, 778-783
66. Colyer, R.A., Burdette, K.E. & Kidwell, W.R. (1973)
Poly ADP-Ribose Synthesis and DNA Replication in Synchronized Mouse L-Cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications 55, 960-966
67. Cox, R. (1981a)
Ethionine Alters the Urinary Excretion of N¹-Methylnicotinamide.
Cancer Letters 14, 137-142
68. Cox, R. (1981b)
Ethionine via S-Adenosylethionine Inhibits Nicotinamide Methylation and the Urinary Excretion of 1-Methylnicotinamide (Meeting Abstract).
Proceedings of the American Association for Cancer Research 22, 79
69. Craddock, V.M. (1970)
Transfer RNA Methylases and Cancer.
Nature 228, 1264-1268
70. Deguchi, T. & Barchas, J. (1971)
Inhibition of Transmethylations of Biogenic Amines by S-Adenosylhomocysteine.
Journal of Biological Chemistry 246, 3175-3181
71. Dietrich, L.S. (1971)
Regulation of Nicotinamide Metabolism.
American Journal of Clinical Nutrition 24, 800-804
72. Dietrich, L.S., Fuller, L., Yero, I.L. & Martinez, L. (1965)
Nicotinamide Mononucleotide Pyrophosphorylase Activity in Ascites Cell Extracts.
Nature 208, 347-348
73. Dietrich, L.S., Fuller, L., Yero, I.L. & Martinez, L. (1966)
Nicotinamide Mononucleotide Pyrophosphorylase Activity in Animal Tissues.
Journal of Biological Chemistry 241, 188-191
74. Dietrich, L.S., Martinez, L. & Franklin, L. (1968a)
Role of the Liver in Systemic Pyridine Nucleotide Metabolism.
Naturwissenschaften 55, 231-232

75. Dietrich, L.S., Muniz, O. & Powanda, M. (1968b)
NAD Synthesis in Animal Tissues.
Journal of Vitaminology 14, 123-129
76. Eagle, H. (1956)
Relative Growth-Promoting Acitivity in Tissue Culture and Co-Factors and the Parent Vitamins.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 91, 358-361
77. Elford, H.L., Freese, M., Passamani, E. & Morris, H.P. (1970)
Ribonucleotide Reductase and Cell Proliferation: I. Variations of Ribonucleotide Reductase Acitivity with Tumor Growth Rate in a Series of Rat Hepatomas.
Journal of Biological Chemistry 245, 5228-5233
78. Ellinger, P. (1948)
The Formation of Nicotinamide from Nicotinic Acid by the Rat.
Biochemical Journal 42, 175-181
79. Ellinger, P. & Abde? Kader, M.M. (1949)
Nicotinamide Metabolism in Mammals.
Biochemical Journal 44, 77-87
80. Ellinger, P., Benesch, R. & Hardwick, S.W. (1945)
Nicotinamide Methochloride Elimination Tests.
The Lancet II, 197-199
81. Ellinger, P. & Coulson, R.A. (1944)
The Urinary Elimination of Nicotinamide Methochloride by Man.
Biochemical Journal 38, 265-270
82. Ellinger, P. & Hardwick, S.W. (1947)
The Nicotinamide Saturation Test.
British Medical Journal I, 672-676
83. Evans, L.S., Almeida, M.S., Lynn, D.G. & Nakanishi, K. (1979)
Chemical Characterization of a Hormone that Promotes Cell Arrest in G₂ in Complex Tissues.
Science 203, 1122-1123
84. Felsted, R.L. & Chaykin, S. (1967)
N¹-Methylnicotinamide Oxidation in a Number of Mammals.
Journal of Biological Chemistry 242, 1274-1279

85. Felsted, R.L., Chu, A.E. & Chaykin, S. (1973)
Purification and Properties of the Aldehyde Oxidases from Hog and Rabbit Livers.
Journal of Biological Chemistry 248, 2580-2587
86. Ferdinandus, J.A., Morris, H.P. & Weber, G. (1971)
Behaviour of Opposing Pathways of Thymidine Utilization in Differentiating Regenerating and Neoplastic Liver.
Cancer Research 31, 550-556
87. Ferris, G.M. & Clark, J.B. (1971)
Nicotinamide Nucleotide Synthesis in Regenerating Rat Liver.
Biochemical Journal 121, 655-662
88. Ferris, G.M. & Clark, J.B. (1972)
The Control of Nucleic Acid and Nicotinamide Nucleotide Synthesis in Regenerating Rat Liver.
Biochemical Journal 128, 869-877
89. Findlay, G.H. (1963)
Epidermal Diphosphopyridine Nucleotide in Normal and Pellagrous Bantu Subjects.
British Journal of Dermatology 75, 249-253
90. Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. (1980)
in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 3. Auflage,
S. 44
Bibliographisches Institut, Mannheim
91. Forth, W., Henschler, B. & Rummel, W. (1983)
in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 4. Auflage, S. 401, 411-412
Bibliographisches Institut, Mannheim
92. Gardner, D.A., Sato, G.H. & Kaplan, N.O. (1972)
Pyridine Nucleotides in Normal and Nicotinamide Depleted Adrenal Tumor Cell Cultures.
Developmental Biology 28, 84-93
93. Gartemann, A., Bredehorst, R., Wielckens, K., Strätling, W.H.H. & Hilz, H. (1981)
Mono- and Poly-ADP Ribosylation of Proteins in Mouse Kidney after Castration and Testosterone Treatment.
Biochemical Journal 198, 37-44

94. Gerber, G.B. & Deroo, J. (1970)
Metabolism of Labeled Nicotinamide Coenzyme in Different Organs of Mice and Rats.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 134, 689-693
95. Gerschenson, L.E., Andersson, M., Malson, J. & Okigaki, T. (1970)
Tyrosine Transaminase Induction by Dexamethasone in a Rat Liver Cell Line.
Science 170, 859-861
96. Gholson, R.K. (1968)
Regulation of NAD Biosynthesis via the Pyridine Nucleotide Cycle.
Journal of Vitaminology 14, 114-122
97. Gill, D.M. (1972)
Poly (Adenosine Diphosphate Ribose) Synthesis in Soluble Extracts of Animal Organs.
Journal of Biological Chemistry 247, 5964-5971
98. Glock, G.E. & McLean, P. (1957)
Levels of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide in Tumors.
Biochemical Journal 65, 413-416
99. Goldsmith, G.A. (1965)
Niacin: Antipellagra Factor, Hypocholesterolemic Agent.
Journal of the American Medical Association 194, 167-173
100. Goldsmith, G.A., Miller, D.N. & Unglaub, W.G. (1961)
Efficiency of Tryptophan as a Niacin Precursor in Man.
Journal of Nutrition 73, 172-176
101. Gray, D.A., Durkacz, R.W. & Shall, S. (1981)
Inhibitors of Nuclear ADP-Ribosyl Transferase Retard DNA Repair after N-Methyl-N-nitroso-urea. Further Evidence for the Involvement of (ADP-Ribose)_n in DNA Repair.
FEBS Letters 131, 173-177
102. Green, S. & Bodansky, O. (1963)
Quantitative Aspects of the Relationship between Nicotinamide Adenine Dinucleotide and the Enzyme Nicotinamide Adenine Dinucleotide Glycohydrolase in Ehrlich Ascites Cells.
Journal of Biological Chemistry 238, 2119-2122

103. Green, S. & Dobrjansky, A. (1967)
Relationship of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Glycohydrolase Activity to Nicotinamide Adenine Dinucleotide Content and Rate of Proliferation of Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Cancer Research 27, 2261-2266
104. Greenbaum, A.L. & Pinder, S. (1968)
The Pathway of Biosynthesis of Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide in Rat Mammary Gland.
Biochemical Journal 107, 55-62
105. Greengard, P., Kalinsky, H., Manning, T.J. & Zak, S.B. (1968)
Prevention and Remission by Adrenocortical Steroids of Nicotinamide Deficiency Disease. II. A Study of the Mechanism.
Journal of Biological Chemistry 243, 4216-4221
106. Greengard, P., Petrack, B. & Kalinsky, H. (1967)
Effect of Hypophysectomy on Pyridine Nucleotide Metabolism: The Role of Nicotinamide.
Journal of Biological Chemistry 242, 152-154
107. Greengard, P., Sigg, E.B., Fratta, I. & Zak, S.B. (1966)
Prevention and Remission by Adrenocortical Steroids of Nicotinamide Deficiency Disorders and of 6-Aminonicotinamide Toxicity in Rats and Dogs.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 154, 624-631
108. Greenlee, L. & Handler, P. (1964)
Xanthine Oxidase. VI: Influence of pH on Substrate Specificity.
Journal of Biological Chemistry 239, 1090-1095
109. Greenstein, J.P. (1942)
Tumor Enzymology.
Journal of the National Cancer Institute 3, 419-447
110. Gross, H.J. & Wildenauer, D. (1972)
Enzymatic Methylations. II: In vitro Inhibition of t-RNA and Protein Methylation by Nicotinamide and Isonicotinic Acid Hydrazide: Activation of a S-Adenosylmethionine-Splitting Enzyme in Rat Liver.
Biochemical and Biophysical Research Communications 48, 58-64
111. Gross, R. & Schölmerich, P. (1982a)
in: Lehrbuch der Inneren Medizin, 6. Auflage, S. 650
Schattauer Verlag, Stuttgart

112. Gross, R. & Schölmerich, P. (1982b)
in: Lehrbuch der Inneren Medizin, 6. Auflage, S. 777
Schattauer Verlag, Stuttgart
113. Grunicke, H., Liersch, M., Hinz, M., Puschendorf, B., Richter, E. & Holzer, H. (1969)
Die Bedeutung des Nikotinsäureamid für die Synthese des NAD in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Biochimica et Biophysica Acta 121, 228-240
114. Haines, M.E., Johnston, I.R., Matthias, A.P. & Ridge, D. (1969)
The Synthesis of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide and Poly (Adenosine Diphosphate Ribose) in Various Classes of Rat Liver Nuclei.
Biochemical Journal 115, 881-887
115. Halpern, R.M., Chaney, S.Q., Halpern, B.C. & Smith, R.A. (1971)
Nicotinamide: A Natural Inhibitor of t-RNA Methylase.
Biochemical and Biophysical Research Communications 42, 602-607
116. Handler, P. & Dann, W.J. (1942)
The Inhibition of Rat Growth by Nicotinamide.
Journal of Biological Chemistry 146, 357-368
117. Hankes, L.V., Henderson, L.M., Brickson, W.L. & Elvehjem, C.A. (1948)
Effect of Amino Acids on the Growth of Rats on Niacin-Tryptophan Deficient Rations.
Journal of Biological Chemistry 174, 873-881
118. Harris, L.J. & Kodicek, E. (1950)
Quantitative Studies and Dose-Response Curves in Nicotinamide Deficiency.
British Journal of Nutrition 4, 13-14
119. Hayaishi, O. & Ueda, K. (1977)
Poly (ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins.
Annual Review of Biochemistry 46, 95-116
120. Hillyard, D., Rechsteiner, M.C. & Olivera, B.M. (1973)
Pyridine Nucleotide Metabolism in Mammalian Cells.
Journal of Cellular Physiology 82, 165-180
121. Hilz, H., Adamietz, P., Bredehorst, R. & Wielckens, K. (1978)
ADP-Ribosylation of Nuclear Proteins.
Advances in Enzyme Regulation 17, 195-211

122. Hilz, H. & Kittler, M. (1971)
Lack of Correlation Between Poly (ADP-Ribose) Formation and DNA-Synthesis.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 353, 848-849
123. Hilz, H. & Stone, P (1976)
ADP-Ribosylation of Proteins.
Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology 76, 1-58
124. Hirsch, A. (1962a)
in: Biographisches Lexikon hervorragender Ärzte vor 1880, S. 847
Urban und Schwarzenberg, Berlin
125. Hirsch, A. (1962b)
in: Biographisches Lexikon hervorragender Ärzte vor 1880, S. 607
Urban und Schwarzenberg, Berlin
126. Hirsch, G.H. & Pakuts, A.P. (1974)
Renal Cortical Slice Uptake and Runout of N-Methylnicotinamide and p-Aminohippurate after Potassium Dichromate Treatment.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 52, 465-468
127. Hochberg, M., Melnick, D. & Oser, B.L. (1945)
Chemical Determination and Urinary Excretion of the Metabolite N¹-Methylnicotinamide.
Journal of Biological Chemistry 158, 265-278
128. Hoffman, D.R., Marion, D.W., Cornatzer, W.E. & Duerre, J.A. (1980)
S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine Metabolism in Isolated Rat Liver.
Journal of Biological Chemistry 255, 10822-10827
129. Holohan, P.D. & Ross, C.R. (1980)
Mechanisms of Organic Cation Transport in Kidney Plasma Membrane Vesicles. 1. Countertransport Studies.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 215, 191-197
130. Holtlund, J., Kristensen, T., Østvold, A.-C. & Leland, S.-G. (1981)
Comparison of Purified Poly (ADP-Ribose) Polymerases in Ehrlich Ascites Tumor Cells, Pig Thymus and HeLa S3 Cells.
European Journal of Biochemistry 119, 23-29
131. Horwitt, M.K., Harvey, C.C., Rothwell, W.S., Cutler, J.L. & Haffron, D. (1956)
Tryptophan-Niacin Relationship in Man.
Journal of Nutrition 60, 1-43

132. Hoshino, J., Kühne, U. & Kröger, H. (1982a)
Methylation of Nicotinamide in Rat Liver Cytosol and its Correlation with Hepatocellular Proliferation.
Biochimica et Biophysica Acta 719, 518-526
133. Hoshino, J., Kühne, U. & Kröger, H. (1982b)
Enhancement of DNA Synthesis and Cell Proliferation by 1-Methylnicotinamide in Rat Liver Cells in Culture: Implication for its in vivo Role.
Biochemical and Biophysical Research Communication 105, 1446-1452
134. Hoshino, J., Schlüter, U. & Kröger, H. (1984)
Nicotinamide Methylation and its Relation to NAD Synthesis in Rat Liver Tissue Culture: Biochemical Basis for the Physiological Activities of 1-Methylnicotinamide.
Biochimica et Biophysica Acta 801, 250-258
135. Hoshino, J., Studinger, G. & Körger, H. (1980)
Enhancement by Streptozotocin and N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of the Tyrosine Aminotransferase Activity in Cultured Rat Liver Cells: Role of Dexamethasone and NAD.
Chemico-Biological Interactions 32, 267-279
136. Hoshino, J., Studinger, G. & Kröger, H. (1981)
Indirect Involvement of Glucocorticoids in the Dibutyryl Cyclic AMP-Induction of Tyrosine Aminotransferase in Cultured Rat Liver Cells: Analysis Using Gonadal Anti-Glucocorticoids.
Journal of Steroid Biochemistry 14, 149-154
137. Huff, J.W. (1947)
The Fluorescent Condensation Product of N¹-Methylnicotinamide and Acetone.
Journal of Biological Chemistry 167, 151-156
138. Huff, J.W. & Perlzweig, W.A. (1943a)
N¹-Methylnicotinamide, a Metabolite of Nicotinic Acid in the Urine.
Journal of Biological Chemistry 150, 395-400
139. Huff, J.W. & Perlzweig, W.A. (1943b)
The Probable Identity of Najjar and Holt's Fluorescent Substance F₂.
Science 97, 538-539
140. Ichiyama, A., Nakamura, S. & Nishizuka, Y. (1967a)
Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) in Mammals and its Regulating Mechanism, Part I.
Arzneimittelforschung 17, 1346-1355

141. Ichiyama, A., Nakamura, S. & Nishizuka, Y. (1967b)
Studies on the Biosynthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) in Mammals and its Regulating Mechanism, Part II.
Arzneimittelforschung 17, 1525-1530
142. Im, Y.S., Chiang, P.K. & Cantoni, G.L. (1979)
Guanidoacetate Methyltransferase: Purification and Molecular Properties.
Journal of Biological Chemistry 154, 11047-11050
143. Immich, H. (1974)
in: Medizinische Statistik, S. 326-332
Schattauer Verlag, Stuttgart
144. Jacobson, E.L. & Jacobson, M.K. (1976)
Pyridine Nucleotide Levels as a Function of Growth in Normal and Transformed 3T3 Cells.
Archives of Biochemistry and Biophysics 175, 627-634
145. Jacobson, E.L., Lange, R.A. & Jacobson, M.K. (1979)
Pyridine Nucleotide Synthesis in 3T3 Cells.
Journal of Cellular Physiology 99, 417-426
146. Jedeikin, L.A., Thomas, A.J. & Weinhouse, S. (1956)
Metabolism of Neoplastic Tissue. X. Diphosphopyridine Nucleotide Levels during Azo Dye Hepatocarcinogenesis.
Cancer Research 16, 867-872
147. Jedeikin, L.A. & Weinhouse, S. (1955)
Metabolism of Neoplastic Tissue. VI. Assay of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide in Normal and Neoplastic Tissues.
Journal of Biological Chemistry 213, 271-280
148. Jerauld, R. & Silberblatt, F.J. (1978)
Effect of N¹-Methylnicotinamide on the Renal Accumulation and Reabsorption of Gentamicin in Rats.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 13, 893-894
149. Johansson-Brittebo, E. & Tjälve, H. (1979)
The Fate of [¹⁴C]Streptozotocin in Nicotinamide-Pretreated Mice: Observations on Pancreatic Islet Radioactivity and Urinary [N¹-Methyl-¹⁴C]Nicotinamide Excretion.
Cancer Letters 8, 169-176

150. Johnson, B.C., Hamilton, T.S. & Mitchell, H.H. (1945)
The Excretion of Nicotinic Acid, Nicotinamide, Nicotinuric Acid and N¹-Methylnicotinamide by Normal Individuals.
Journal of Biological Chemistry 159, 231-236
151. Johnson, G.S. (1980a)
Metabolism of NAD and N¹-Methylnicotinamide in Growing and Growth-Arrested Cells.
European Journal of Biochemistry 112, 635-641
152. Johnson, G.S. (1980b)
Effects of Pyridine Derivates on Cultured Cells: Evidence for an Involvement of ADP-Ribosylation in Growth Regulation and Cyclic AMP Metabolism.
in: Novel ADP-Ribosylations of Regulatory Enzymes and Proteins (SMULSON, M. & SUGIMURA, T., Eds.), S. 295-302
Elsevier, New York
153. Johnson, G.S. (1981)
Benzamide and its Derivates Inhibit Nicotinamide Methylation as well as ADP-Ribosylation.
Biochemistry International 2, 611-617
154. Johnson, G.S. & Chiang, P.K. (1981)
1-Methylnicotinamide and NAD-Metabolism in Normal and Transformed Normal Rat Kidney Cells.
Archives of Biochemistry and Biophysics 210, 1263-1269
155. Kalashnikova, V.P. (1967)
Vitamin Metabolism in Experimental Acute Radiation Sickness.
Medicinskaja radiologija 12, 89-91
156. Kamat, J.P., Narurkar, L.M., Mhatre, N.A. & Narurkar, M.V. (1980)
Nicotinamide-Induced Hepatic Microsomal Mixed Function Oxidase System in Rats.
Biochimica et Biophysica Acta 628, 26-34
157. Kaplan, N.O., Goldin, A., Humphreys, S.R., Ciotti, M.M. & Stolzenbach, F.E. (1956)
Pyridine Nucleotide Synthesis in the Mouse.
Journal of Biological Chemistry 219, 287-298

158. Kating, H. & Drephal, G. (1974)
Das Antipellagra-Vitamin Nikotinsäure-Nicotinsäureamid.
in: Fermente, Hormone, Vitamine, Vol. III/1
(AMMON, R. & DIRSCHERL, W., Eds.), S. 727-767
Thieme Verlag, Stuttgart
159. Keller, J., Liersch, M. & Grunicke, H. (1971)
Studies on the Biosynthesis of NAD from Nicotinamide and the Intracellular Pyridine Nucleotide Cycle in Isolated Perfused Rat Liver.
European Journal of Biochemistry 22, 263-270
160. Kerr, S.J. (1972)
Competing Methyltransferase Systems.
Journal of Biological Chemistry 247, 4248-4252
161. Kidwell, W.R. & Watts, R. (1974)
Poly (ADP-Ribose) Synthesis in Synchronized Mouse L-Cells.
Federation Proceedings 33, 1413
162. Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I. & Ross, C.R. (1979)
Transport of Organic Ions in Renal Cortical Luminal and Antiluminal Membrane Vesicles.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 209, 443-450
163. Klemperer, H.G. & Haynes, G.R. (1968)
Thymidine Kinase in Rat Liver during Development.
Biochemical Journal 108, 541-546
164. Knox, W.E. (1946)
The Quinine-Oxidizing Enzyme and Liver Aldehyde Oxidase.
Journal of Biological Chemistry 163, 699-711
165. Knox, W.E. (1972a)
in: Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues.
S.222-254
Karger, Basel
166. Knox, W.E. (1972b)
in: Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues.
S. 185-221
Karger, Basel

167. Knox, W.E. (1972c)
in: Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues.
S. 164-184
Karger, Basel
168. Knox, W.E. (1972d)
in: Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues.
S. 23-33
Karger, Basel
169. Knox, W.E. & Grossman, W.I. (1947)
The Isolation of the 6-Pyridone of N¹-Methylnicotinamide from Urine.
Journal of Biological Chemistry 168, 363-366
170. Kochhar, B.D. (1948)
Laboratory Diagnosis of Nicotinic Acid Deficiency.
Annals of Biochemistry and Experimental Medicine 8, 23-32
171. Krehl, W.A., Sarma, P.S., Tply, L.J. & Elvehjem, C.A. (1964)
Factors Affecting the Dietary Niacin and Tryptophan Requirement of the Growing Rat.
Journal of Nutrition 81, 85-106
172. Krehl, W.A., Tply, L.J. & Elvehjem, C.A. (1945a)
Corn as an Etiological Factor in the Production of a Nicotinic Acid Deficiency in the Rat.
Science 101, 283
173. Krehl, W.A., Tply, L.J. Sarma, P.S. & Elvehjem, C.A. (1945b)
Growth-Retarding Effect of Corn in Nicotinic Acid-Low Rations and its Counteraction by Tryptophan.
Science 101, 489-490
174. Kröger, H. (1963)
Die Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels von Tumoren durch Chemotherapeutika.
Zeitschrift für naturwissenschaftlich-medizinische Grundlagenforschung 1, 126-142
175. Kröger, H. & Grätz, R. (1978)
Induktion der Tyrosin Aminotransferase [E.C. 2.6.1.5.] in der Rattenleber durch Nikotinsäureamid.
Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 16, 525-529

176. Kunz, K. & Musil, J. (1979)
Metabolic Turnover of Pyridine Nucleotides in Ascites Cells of Sarcoma 180 and in the Liver Tissue of Rats before and after Ionizing Radiation.
Neoplasma 26, 565-575
177. Lamborg, M., Stolzenbach, F.E. & Kaplan, N.O. (1958)
The Nicotinic Acid Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide.
Journal of Biological Chemistry 231, 685-694
178. Landauer, W. (1948)
The Effect of Nicotinamide and α -Ketoglutaric Acid on the Teratogenic Action of Insulin.
Journal of Experimental Zoology 109, 283-290
179. Landauer, W. (1953)
On the Teratogenic Effects of Pilocarpine in Chick Development.
Journal of Experimental Zoology 122, 469-483
180. Landauer, W. (1957)
Niacin Antagonists and Chick Development.
Journal of Experimental Zoology 136, 509-530
181. Landauer, W. & Wakasugi, N. (1966)
Problems of Acetazolamide and N-Ethylnicotinamide as Teratogens.
Journal of Experimental Zoology 164, 499-516
182. Lawson, D., Paik, W.K., Morris, H.P. & Weinhouse, S. (1975)
Carbaryl Phosphate Synthetases in Rat Liver Neoplasms.
Cancer Research 35, 156-163
183. Lawson, D., Paik, W.K., Morris, H.P. & Weinhouse, S. (1977)
Urea Synthesis in Novikoff and Morris Hepatomas.
Cancer Research 37, 850-856
184. Lazarus, S.S. & Shapiro, S.H. (1973)
Influence of Nicotinamide and Pyridine Nucleotides on Streptozotocin and Alloxan-Induced Pancreatic B Cell Cytotoxicity.
Diabetes 22, 499-506
185. Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S., Shall, S. & Whish, W.J.D. (1974)
The Relationship Between Cell Growth, Macromolecular Synthesis and Poly ADP-Ribose Polymerase in Lymphoid Cells.
Experimental Cell Research 83, 63-72

186. Leiber, U., Kittler, M. & Hilz, H (1973)
Enzymes of Poly (ADPR) Metabolism in Proliferating and Nonproliferating Liver Tissues.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 354, 1347-1350
187. Leifer, E., Lloyd, J.R., Hogness, D.S. & Corson, M.H. (1951)
The Metabolism of Radioactive Nicotinic Acid and Nicotinamide.
Journal of Biological Chemistry 190, 595-602
188. Liau, M.C., Chang, C.F., Belanger, L. & Grenier, A. (1979)
Correlation of Isozyme Patterns of S-Adenosylmethionine Synthetase with Fetal Stages and Pathological States of the Liver.
Cancer Research 39, 162-169
189. Liau, M.C., Hunt, M.E. & Hurlbert, R.B. (1976)
Role of Ribosomal RNA Methylases in the Regulation of Ribosome Production in Mammalian Cells.
Biochemistry 15, 3158-3164
190. Liau, M.C., Lin, G.W. & Hurlbert, R.B. (1977)
Partial Purification and Characterization of Tumor and Liver Adenosylmethionine Synthetases.
Cancer Research 37, 427-435
191. Lis, A.W., Bijan, R., Lis, E.W. & de Hackbeil, K.F. (1968)
Ultraviolet Absorbing Urinary Compounds of Mentally Retarded Children and Schizophrenic Adults.
Clinical Chemistry 14, 391-396
192. Lis, E.W., Bijan, R. & Lis, A.W. (1966)
The Urinary Excretion of 5-Ribosyluracil and N-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide in Mentally Retarded Children.
Journal of Cell Biology 31, 150A
193. Lis, E.W., Lis, A.W. & de Hackbeil, K.F. (1970)
Ultraviolet Absorbing Components of Urine from Mentally Retarded Children.
Clinical Chemistry 16, 714-721
194. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979a)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 569-570
Springer Verlag, Berlin
195. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979b)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 450-452
Springer Verlag, Berlin

196. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979c)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 470-485
Springer Verlag, Berlin
197. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979d)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 192-208
Springer Verlag, Berlin
198. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979e)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 271-276
Springer Verlag, Berlin
199. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979f)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 693
Springer Verlag, Berlin
200. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979g)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 862
Springer Verlag, Berlin
201. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979h)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 435-436
Springer Verlag, Berlin
202. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979i)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 202-204
Springer Verlag, Berlin
203. Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A. (1979je)
in: Physiologische Chemie, 2. Auflage, S. 883-885
Springer Verlag, Berlin
204. Löfrath, G. & Wennerberg, R. (1974)
Methylation of Purines and Nicotinamide in the Rat by Dichlorvos.
Zeitschrift für Naturforschung 29, 651
205. Löhrke, H. & Hesse, B. (1980)
Tumorsteckbrief 2: Das Zajdela-Hepatom auf der SD-Ratte, S. 5 - 41
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle
Pathologie
206. Löhrke, H. & Hesse, B. (1981)
Tumorsteckbrief 3: Das Novikoff-Hepatom auf der SD-Ratte, S. 11-52
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle
Pathologie

207. Lojkin, M.E. (1956)
Effects of Ovariectomy and Administration of Ovarian Hormones and Testosterone on Nicotinic Acid Metabolism of Rats.
Journal of Nutrition 59, 443-457
208. Lojkin, M.E., Wertz, A.W. & Dietz, C.G. (1952)
Metabolism of Nicotinic Acid in Pregnancy.
Journal of Nutrition 46, 335-352
209. Lombardini, J.B. & Talalay (1971)
Formation, Functions and Regulatory Importance of S-Adenosyl-L-Methionine.
Advances in Enzyme Regulation 9, 349-384
210. Lombardini, J.B. & Talalay, P. (1973)
Effects of Adenosine Triphosphate: L-Methionine S-Adenosyltransferase on Levels of S-Adenosyl-L-methionine and L-Methionine in Normal and Malignant Mammalian Tissues.
Molecular Pharmacology 9, 542-560
211. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
Journal of Biological Chemistry 193, 265-275
212. Märki, F. & Greengard, P. (1966)
Nicotinamide Deamidase in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Biochimica et Biophysica Acta 113, 587-594
213. Mainardi, L., Nicolis, F.B. & Tenconi, L.T. (1962)
Eliminazione urinaria di N¹-metilnicotinamide e di N¹-metil-2-piridone-5-carbossamide nell' uomo: Variazioni in funzione del sesso e dell' età.
Acta Vitaminologica 16, 253-262
214. Matsayama, M., Maekawa, A. & Nagayo, T. (1961)
Inhibiting Effect of Nicotinamide and Diphosphopyridine Nucleotide on the Methylcholanthrene Sarcoma in Rats.
Nature 189, 673-674
215. Maugh, T.H. & Marx, J.L. (1979)
in: Zerstörendes Wachstum, S. 69-96
Thieme Verlag, Stuttgart

216. McDonald, J.W.D. & Stewart, H.B. (1967)
Participation of Nicotinamide Mononucleotide in Pyridine Nucleotide Synthesis in Tumor and Host Liver.
Canadian Journal of Biochemistry 45, 363-373
217. Meselon, M., Yuan, R. & Heywood, J. (1972)
Restriction and Modification of DNA.
Annual Review of Biochemistry 41, 447-466
218. Minaga, T., Marton, L.J., Piper, W.N. & Kun, E. (1978)
Induction of Cardiac L-Ornithine Decarboxylase by Nicotinamide and its Regulation by Putrescine.
European Journal of Biochemistry 91, 577-585
219. Miwa, M., Sugimura, T., Inui, N. & Takayama, S. (1973)
Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) Synthesis During the Cell Cycle of Transformed Hamster Lung Cells.
Cancer Research 33, 1306-1309
220. Morley, C.G.D. & Boyer, J.L. (1977)
Stimulation of Hepatocellular Proliferation by a Serum Factor from Thioacetamide-Treated Rats.
Biochimica et Biophysica Acta 477, 165-176
221. Morris, H.P. (1965)
Studies on the Development, Biochemistry and Biology of Experimental Hepatomas.
Advances in Cancer Research 9, 228-296
222. Morris, H.P. & Chris, W.E. (1977a)
in: Morris Hepatomas - Mechanisms of Regulation, S. 1 - 37
Plenum, New York
223. Morris, H.P. & Chris, W.E. (1977b)
in: Morris Hepatomas - Mechanisms of Regulation, S. 89-116
Plenum, New York
224. Morris, H.P. & Chris, W.E. (1977c)
in: Morris Hepatomas - Mechanisms of Regulation, S. 565-582
Plenum, New York
225. Morris, H.P. & Chris, W.E. (1977d)
in: Morris Hepatomas - Mechanisms of Regulation, S. 39-58
Plenum, New York

226. Morris, H.P. & Slaughter, L.J. (1979)
Development, Growth Rate, Degree of Malignancy and Chromosome Pattern of Morris Transplantable Hepatomas.
Journal of Toxicology and Environmental Health 5, 433-452
227. Morris, H.P. & Wagner, B.P. (1968)
Induction and Transplantation of Rat Hepatomas with Different Growth Rate (including "Minimal Deviation Hepatomas").
Methods in Cancer Research 4, 125-152
228. Morrison, M.A., Reynolds, M.S. & Harper, A.E. (1963)
Effect of Increments of Tryptophan and Niacin on Growth and on the Concentrations of Blood and Liver Pyridine Nucleotides.
Journal of Nutrition 80, 441-446
229. Morton, R.K. (1958)
Enzymatic Synthesis of Coenzyme I in Relation to Chemical Control of Cell Growth.
Nature 181, 541-543
230. Mosher, L.R. (1970)
Nicotinic Acid Side Effects and Toxicity: A Review.
American Journal of Psychiatry 126, 1290-1296
231. Mrochek, J.E., Jolley, R.L., Young, D.S. & Turner, W.J. (1976)
Metabolic Response of Humans to Ingestion of Nicotinic Acid and Nicotinamide.
Clinical Chemistry 22, 1821-1827
232. Najjar, V.A. & Holt, L.E. (1941a)
The Excretion of Specific Fluorescent Substances in the Urine in Pellagra.
Science 93, 20-21
233. Najjar, V.A. & Holt, L.E. (1941b)
Effect of Ingestion of Various Pyridine Compounds on Excretion of Specific Fluorescent Substances in Urine.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 48, 413-414
234. Najjar, V.A. & Wood, R.W. (1940)
Presence of a hitherto Unrecognized Nicotinic Acid Derivate in Human Urine.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 44, 386-390

235. Narrod, S.A., Bonavita, V., Ehrenfeld, E.R. & Kaplan, N.O. (1961)
Effect of Azaserine on the Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide in Mouse.
Journal of Biological Chemistry 236, 931-935
236. Nemeth, A.M. (1959)
Mechanisms Controlling Changes in Tryptophan Peroxidase Activity in Developing Mammalian Liver.
Journal of Biological Chemistry 234, 2921-2924
237. Nemeth, A.M. & Dickerman, H. (1960)
Pyridine Nucleotides and Diphosphopyridine Nucleotidase in Developing Mammalian Tissues.
Journal of Biological Chemistry 235, 1761-1763
238. Neuweiler, W. (1944)
Der Nikotinsäuregehalt der Frauenmilch und seine Abhängigkeit von der Zufuhr.
Zeitschrift für Vitaminforschung 15, 193-197
239. Nishizuka, Y., Ueda, K., Nakazawa, K. & Hayaishi, O. (1967)
Studies on the Polymer of Adenosine Diphosphate Ribose.
Journal of Biological Chemistry 242, 3164-3171
240. Nisselbaum, J.S. & Green, S. (1969)
A Simple Ultramicro Method for Determination of Pyridine Nucleotide in Tissues.
Analytical Biochemistry 27, 212-217
241. Nomura, H., Tanigawa, Y., Kitamura, A. & Kawakami, K. (1981)
"Poly(ADP-Ribose)-Sensitive Endonuclease" and the Repair of DNA Damaged by N-Methyl-N-nitrosourea.
Biochemical and Biophysical Research Communications 98, 806-814
242. Nomura, K., Shin, M., Sano, K., Umezawa, C. & Shimada, T. (1983)
Effect of Nicotinamide Administration to Rats on the Liver Microsomal Drug Metabolizing Enzymes.
International Journal of Vitaminology and Nutrition Research 53, 36-43
243. Novikoff, A.B. (1957)
A Transplantable Rat Liver Tumor Induced by 4-Dimethylaminobenzene.
Cancer Research 17, 1010-1027

244. Novell, P.C., Morris, H.P. & Potter, V.R. (1967)
Chromosomes of "Minimal Deviation" Hepatomas.
Cancer Research 27, 1561-1579
245. Oesterling, M.J. & Rose, W.C. (1952)
Tryptophan Requirements for Growth and Utilization of its Optical Isomers.
Journal of Biological Chemistry 196, 33-43
246. Ohkubo, M. & Fujimura, S. (1978)
Loss of Activity of an N¹-Methyl-4-pyridine-5-carboxamide-Forming N¹-Methylnicotinamide Oxidase in Livers of Rats Fed 2-Acetylaminofluorene.
Cancer Research 38, 697-702
247. Ohkubo, M. & Sakiyama, S. & Fujimura, S. (1983)
Increase of Nicotinamide Methyltransferase and N¹-Methylnicotinamide Oxidase Activities in the Livers of the Rats Administered Alkylating Agents.
Cancer Letters 21, 175-181
248. Ohkubo, M., Shimizu, M., Kubo, A., & Fujimura, S. (1977)
Increased Urinary Excretion of 1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide in Rats Administered 2-Acetylaminofluorene.
Chemico-Biological Interactions 18, 101-110
249. Oide, H. (1958)
The Influence of the Intrasplenic Implantation of Nicotinamide on the Mitotic Activity and the Phosphopyridine Nucleotide Content of Regenerating Liver.
Gann 49, 49-56
250. Oikawa, A., Tohda, H., Kanai, M., Miwa, M. & Sugimura, T. (1980)
Inhibitors of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) Polymerase Induce Sister Chromatid Exchanges.
Biochemical and Biophysical Research Communications 97, 1311-1316
251. Olivera, B.M. & Ferro, A.M. (1982)
Pyridine Nucleotide Metabolism and ADP-Ribosylation.
in: ADP-Ribosylation Reactions (HAYAISHI, O. & UEDA, K., Eds.) S. 19-40
Academic Press, New York
252. Okada, G., Sawai, Y., Teraoka, H. & Tsukada, K. (1979)
Differential Effects of Dimethylsulfoxide on S-Adenosylmethionine Synthetase from Rat Liver and Hepatoma.
FEBS Letters 106, 25-28

253. Okada, G., Teraoka, H. & Tsukada, K. (1981)
Multiple Species of Mammalian S-Adenosylmethionine Synthetase.
Partial Purification and Characterization.
Biochemistry 20, 934-940
254. Oshiro, Y., Gerschenson, L.E. & DiPaolo, J.A. (1972)
Carcinomas from Rat Liver Cells Transformed Spontaneously in Culture.
Cancer Research 32, 877-879
255. Ove, P., Jenkins, M.D. & Laszlo, J. (1970)
DNA Polymerase Patterns in Developing Rat Liver.
Cancer Research 30, 535-539
256. Ove, P., Laszlo, J., Jenkins, M.D. & Morris, H.P. (1969)
Increased DNA Polymerase Activity in a Series of Rat Hepatomas.
Cancer Research 29, 1557-1561
257. Paik, W.K. & Kim, S. (1971)
Protein Methylation.
Science 174, 114-119
258. Pardue, W.D. (1961)
Severe Liver Dysfunction During Nicotinic Acid Therapy.
Journal of the American Medical Association 175, 137-138
259. Pasquariello, G. (1964)
Ricerche sulla linea triptofano → acido nicotinic nel diabete mellito.
Acta Vitaminologica (Milano) 18, 225-234
260. Patterson, J.I. & Harper, A.E. (1982a)
Effect of Tryptophan Intake on Oxidation of [7 α -¹⁴C]Tryptophan and Urinary Excretion of N¹-Methylnicotinamide in the Rat.
Journal of Nutrition 112, 766-775
261. Patterson, J.I. & Harper, A.E. (1982b)
Effect of Nicotinamide Intake on Urinary Excretion of N¹-Methylnicotinamide and Oxidation of [7 α -¹⁴C]Tryptophan in the Rat.
Journal of Nutrition 112, 776-781
262. Perin, A., Sessa, A. & Ciaranfi, E. (1978)
Carcinostatic Effect of Aliphatic Aldehydes and Aldehyde Dehydrogenase Activity in Ehrlich Carcinoma, Sarcoma 180 and Yoshida AH-130 Hepatoma.
Cancer Research 38, 2180-2184

263. Perlzweig, W.A., Bernheim, M.L.C. & Bernheim, F. (1943)
The Methylation of Nicotinamide by Rat Liver in vitro.
Journal of Biological Chemistry 150, 401-106
264. Perlzweig, W.A., Rosen, F., Leder, I.G., Hunter, S. & Pearson, P.B. (1949)
Comparative Studies in Niacin Metabolism.
Federation Proceedings 8, 236
265. Petrack, B., Greengard, P. & Kalinsky, H. (1966)
On the Relative Efficacy of Nicotinamide and Nicotinic Acid as Precursors of Nicotinamide Adenine Dinucleotide.
Journal of Biological Chemistry 241, 2367-2372
266. Porcellati, G. & Quagliariello, G. (1955)
Alcuni Aspetti del Metabolismo in vitro della Nicotinamide.
Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale 31, 1330-1334
267. Preiss, J. & Handler, P. (1958a)
Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide I: Identification of Intermediates.
Journal of Biological Chemistry 233, 488-492
268. Preiss, J. & Handler, P. (1958b)
Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide II: Enzymatic Aspects.
Journal of Biological Chemistry 233, 493-500
269. Preiss, J., Schlaeger, R. & Hilz, H. (1971)
Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase by Thymidine and Nicotinamide in HeLa Cells.
FEBS Letters 19, 244-246
270. Purko, J. & Stewart, H.B. (1966)
The Mechanism of Pyridine Nucleotide Synthesis in Ehrlich Ascites Carcinoma and Host Liver.
Canadian Journal of Biochemistry 45, 179-190
271. Purnell, M.R., Stone, P.R. & Whish, W.J.D. (1980)
ADP-Ribosylation of Nuclear Proteins.
Biochemical Society Transactions 8, 215-227
272. Quinn, G.P. & Greengard, P. (1966)
The Pathway for the Biosynthesis of N¹-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide.
Archives of Biochemistry and Biophysics 115, 146-152

273. Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. & Handler, P. (1962)
Hepatic Aldehyde Oxidase I: Purification and Properties.
Journal of Biological Chemistry 237, 922-928
274. Rakieten, N., Gordon, B.S., Beaty, A., Cooney, D.A., Davis, R.D. & Schein, P.S. (1971)
Pancreatic Islet Cell Tumors Produced by the Combined Action of Streptozotocin and Nicotinamide.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 137, 280-283
275. Rakieten, N., Gordon, B.S., Beaty, A., Cooney, D.A. & Schein, P.S. (1976)
Modification of Renal Tumorigenic Effect of Streptozotocin by Nicotinamide: Spontaneous Reversibility of Streptozotocin in Diabetes.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 151, 356-361
276. Ramm, B. & Hoffmann, G. (1976)
in: Biomathematik und Medizinische Statistik, S. 312-315 und 363-366
Enke Verlag, Stuttgart
277. Rechsteiner, M. & Hill, K.R. (1975)
Autoradiographic Studies of Nicotinic Acid Utilization in Human-Mouse Heterokaryons and Inhibition of Utilization in Newly Formed Hybrid Cells.
Journal of Cellular Physiology 86, 439-452
278. Rechsteiner, M., Hillyard, D. & Olivera, B.M. (1976)
Turnover of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Cultures of Human Cells.
Journal of Cellular Physiology 88, 207-216
279. Revel, M. & Mandel, P. (1962)
Effect of an Induced Synthesis of Pyridine Nucleotides in vivo on the Metabolism of Ribonucleic Acid.
Cancer Research 22, 456-462
280. Rick, W. (1977)
in: Klinische Chemie und Mikroskopie, 5. Auflage, S. 50-54
Springer Verlag, Berlin
281. Rivin, A.V. (1959)
Jaundice Occurring During Nicotinic Acid Therapy for Hypercholesteremia.
Journal of the American Medical Association 170, 2088-2089

282. Roberts, J.H., Stark, P. & Smulson, M. (1973)
Stimulation of DNA Synthesis by Adenosine Diphosphoribosylation of HeLa Nuclear Proteins During the Cell Cycle.
Biochemical and Biophysical Research Communications 52, 43-50
283. Rochette-Egly, C., Ittel, M.E., Bilen, J. & Mandel, P. (1980)
Effect of Nicotinamide on RNA and DNA Synthesis and on Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity in Normal and Phytohemagglutinin Stimulated Human Lymphocytes.
FEBS Letters 120, 7-11
284. Rosen, F., Huff, J.W. & Perlzweig, W.A. (1946)
The Effect of Tryptophane on the Synthesis of Nicotinic Acid in the Rat.
Journal of Biological Chemistry 163, 343-344
285. Ross, C.R., Diezi-Chomoety, F. & Roch-Ramel, F. (1975)
Renal Excretion of N¹-Methylnicotinamide in the Rat.
American Journal of Physiology 288, 1641-1645
286. Sadoogh-Abasian, F. & Evered, D.F. (1980)
Absorption of Nicotinic Acid and Nicotinamide from Rat Small Intestine.
Biochimica et Biophysica Acta 598, 385-391
287. Sakakida, H. (1956)
Niacin Metabolism I: Critical Studies on the Method of Niacin Loading Test and some Experiments with Nicotinamide.
Vitamins 10, 337-343
288. Salmon, W.D. (1947a)
Relation of Corn Products to the Requirement of the Rat for Dietary Nicotinic Acid.
Journal of Nutrition 33, 169-175
289. Salmon, W.D. (1947b)
Some Physical Relationships of Protein, Fat, Choline, Methionine, Cysteine, Nicotinic Acid and Tryptophane.
Journal of Nutrition 33, 155-168
290. Sanada, H. & Miyazaki, M. (1980)
Regulation of Tryptophan-Niacin Metabolism by Hormones.
Journal of Nutritional Science and Vitaminology 26, 617-627

291. Sarrett, H.J. & Goldsmith, G.A. (1947)
The Effect of Tryptophane on the Excretion of Nicotinic Acid Derivates in Humans.
Journal of Biological Chemistry 167, 293-294
292. Savitskii, I.V. & Zelinski, V.G. (1967)
Effect of some Radiomimetics on Nicotinamide Methylation in Albino Rat Liver Slices.
Voprosy medicinskoj chimii 13, 291-295
293. Schamhart, D.H.J., van de Poll, K.W. & van Wijk, R. (1979)
Comparative Study of Glucose Metabolism in HTC, RLC, MH₁C₁ and Reuber H35 Rat Hepatoma Cells.
Cancer Research 39, 1051-1055
294. Scheid, W. (1983)
in: Lehrbuch der Neurologie, 5. Auflage, S. 962-963
Thieme Verlag, Stuttgart
295. Schein, P.S., Cooney, D.A. & Vernon, M.L. (1967)
The Use of Nicotinamide to Modify the Toxicity of Streptozotocin Diabetes without Loss of Antitumor Activity.
Cancer Research 27, 2324-2332
296. Schoental, R. (1977)
The Role of Nicotinamide and of Certain other Modifying Factors in Diethylnitrosamine Carcinogenesis.
Cancer 40, 1833-1840
297. Schwartz, J.P., Passonneau, J.V., Johnson, G.S. & Pastan, I. (1974)
The Effect of Growth Conditions on NAD⁺ and NADH Concentrations and the NAD⁺:NADH Ratio in Normal and Transformed Fibroblasts.
Journal of Biological Chemistry 249, 4138-4143
298. Shaikh, B., Huang, S.S. & Pontzer, N.J. (1980)
Urinary Excretion of Methylated Purines and 1-Methyl-Nicotinamide Following Administration of Methylating Carcinogens.
Chemico-Biological Interactions 30, 253-256
299. Shaikh, B., Pontzer, J. Huang, S.S. & Zielinski, W.L., Jr. (1977)
Determination of N¹-Methylnicotinamide in Urine by High-Pressure Liquid Chromatography.
Journal of Chromatographic Science 15, 215-217

300. Shall, S. (1972)
Poly(ADP-Ribose).
FEBS Letters 24, 1-6
301. Shin, C.K., Sawada, Y., Iga, T. & Hanano, M. (1982)
Prediction of Renal Tubular Secretion of Tetraethylammonium Bromide by Use of Endogenous N¹-Methylnicotinamide in the Rat.
Journal of Pharmacobiodynamics 5, 534-537
302. Siegenthaler, W. (1979)
in: Klinische Pathophysiologie, 4. Auflage, S. 271-272
Thieme Verlag, Stuttgart
303. Siegenthaler, W., Kaufmann, W., Hornborstel, H. & Waller, H.D. (1984)
in: Lehrbuch der Inneren Medizin, 1. Auflage, S. 14.23-14.24
Thieme Verlag, Stuttgart
304. Smulson, M., Henriksen, O. & Rideau, C. (1971)
Activity of Polyadenosine Diphosphoribose Polymerase During the Human Cell Cycle.
Biochemical and Biophysical Research Communications 43, 1266-1273
305. Smulson, M. & Rideau, C. (1972)
Nuclear Polyadenosine Diphosphoribosylation During Restricted Macromolecular Synthesis of HeLa Cells.
Biochimica et Biophysica Acta 111, 408-416
306. Sneider, T.W. & Potter, V.R. (1969)
Deoxycytidylate Deaminase and Related Enzymes of Thymidine Triphosphate Metabolism in Hepatomas and Precancerous Rat Liver.
Advances in Enzyme Regulation 7, 375-394
307. Sneider, T.W., Potter, V.R. & Morris, H.P. (1969)
Enzymes of Thymidine Triphosphate Synthesis in Selected Morris Hepatomas.
Cancer Research 29, 40-54
308. Stanulović, M. & Chaykin, S. (1971)
Metabolic Origin of the Pyridones of N¹-Methylnicotinamide in Man and Rat.
Archives of Biochemistry and Biophysics 145, 35-42
309. Stone, P.R., Bredehorst, R., Kittler, M., Lengyel, H. & Hilz, H. (1976)
Quantitative Determination of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) in Different Hepatic Tissues by an Isotope Dilution Procedure.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 357, 51-56

310. Stone, P.R. & Shall, S. (1975)
Poly(ADPR) Polymerase Activity During the Growth Cycle of LS Cells.
Experimental Cell Research 91, 95-100
311. Streffer, C. (1975)
The Contribution of Tryptophan to the Regulation of the NAD⁺ Level in Mouse Liver.
Acta Vitaminologica et Enzymologica 29, 262-265
312. Streffer, C. & Scholz, G. (1972)
Metabolism of Pyridine Nucleotides and its Relation to DNA Synthesis in Regenerating Mouse Liver.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 353, 1855-1862
313. Studinger, G. (1979)
Charakterisierung des Contison Rezeptor Proteins aus Rattenleber und vergleichende Untersuchungen dieses Proteins aus normaler und pathologisch veränderter Leber sowie aus Rattenlebergewebe und Rat Liver Cell (RLC)-Kulturen.
Dissertation, Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin, S. 30 und 48-49
314. Sturm, G., Stärk, D., Spengler, U., Nittinger, J., Jaus, H.H., Grässle, B., Siebert, G. & Romen, W. (1980)
Long-Term Perturbation of Pyridine Nucleotides in Rat Liver.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 361, 551-558
315. Sugimura, T., Fujimura, S., Hasegawa, S. & Kawamura, Y. (1967)
Polymerization of the Adenosine 5'-Diphosphate Ribose Moiety of NAD by Rat Liver Nuclear Enzyme.
Biochimica et Biophysica Acta 138, 438-441
316. Sweeney, M.J., Hoffman, D.H. & Poore, G.A. (1967)
Enzymes in Pyrimidine Biosynthesis in Morris Hepatomas.
Proceedings of the American Association for Cancer Research 8, 66
317. Swiatek, K.R., Simon, L.N. & Chao, K.L. (1973)
Nicotinamide Methyltransferase and S-Adenosylmethionine: S'-Methylthioadenosine Hydrolase: Control of Transfer Ribonucleic Acid Methylation.
Biochemistry 12, 4670-4675
318. Tatarskii, V.V. (1955)
Methylation of Nicotinamide in the Liver of Cnacerous Rat.
Voprosy onkologii 1, 101-103

319. Terada, M., Fujiki, H., Marks, P.A. & Sugimura, T. (1979)
Induction of Erythroid Differentiation of Murine Erythroleukemia Cells by Nicotinamide and Related Compounds.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 76, 6411-6414
320. Threlfall, C.J. (1959)
Synthesis of Diphosphopyridine Nucleotide from Nicotinamide by Slices of Liver.
Nature 184, 60-61
321. Tsukada, K. & Okada, G. (1980)
S-Adenosylmethionine Synthetase Isozyme Patterns from Rat Hepatoma Induced by N-2-Fluorenylacetamide.
Biochemical and Biophysical Research Communications 94, 1078-1082
322. Turnheim, K. & Lauterbach, F. (1977)
Secretion of Monoquaternary Ammonium Compounds by Guinea Pig Small Intestine in vivo.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 299, 201-205
323. Utakoji, T., Hosada, K., Umezawa, K., Sawamura, M., Matsushima, T., Miwa, M. & Sugimura, T. (1979)
Induction of Sister Chromatid Exchanges by Nicotinamide in Chinese Hamster Lung Fibroblasts and Human Lymphoblastoid Cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications 90, 1147-1152
324. Van Pilsum, J.F., Stephens, G.C. & Taylor, D. (1972)
Distribution of Creatine, Guanidinoacetate and the Enzymes for their Biosynthesis in Animal Kingdom.
Biochemical Journal 126, 325-345
325. Vajic, B., Sibalic, S. & Radej, N. (1956)
Über den Nikotinsäuregehalt im Blut von Pellagrakranken.
Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung 27, 174-181
326. Vivian, V.M., Chaloupka, M.M. & Reynolds, M.S. (1958)
Some Aspects of Tryptophan Metabolism in Human Subjects: I. Nitrogen Balances, Blood Pyridine Nucleotides and Urinary Excretion of N¹-Methylnicotinamide and N¹-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide in a Low-Niacin Diet.
Journal of Nutrition 66, 587-598

327. Volman, H. (1978)
A Morphologic and Morphometric Study of the Mitochondria in Several Hepatoma Cell Lines and in Isolated Hepatocytes.
Virchows Archiv B. Zellpathologie 26, 249-259
328. Warburg, O. (1956a)
On the Origin of Cancer Cells.
Science 123, 309-314
329. Warburg, O. (1956b)
On Respiratory Impairment in Cancer Cells.
Science 124, 269-270
330. Warburg, O. & Christian, W. (1936a)
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridin-Nucleotide).
Biochemische Zeitschrift 287, 291-328
331. Warburg, O. & Christian, W. (1936b)
Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten.
Helvetica Chimica Acta 19, 79-88
332. Warburg, O., Posener, K. & Negelein, E. (1924)
Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.
Biochemische Zeitschrift 152, 309-344
333. Watson, J.D. (1977a)
in: Molecular Biology of the Gene, 3. Auflage, S. 547-589
W.A. Benjamin, Menlo Park
334. Watson, J.D. (1977b)
in: Molecular Biology of the Gene, 3. Auflage, S. 304-330
W.A. Benjamin, Menlo Park
335. Weber, G. (1977)
Enzymology of Cancer Cells.
New England Journal of Medicine 296, 486-493 und 541-551

336. Weiner, I.M. (1973)
 Transport of Weak Acids and Bases.
 in: Handbook of Physiology: Renal Physiology (R. BERLINER & J. ORLOFF, Eds.), S. 521-554
 American Physiological Society, Washington
337. Weinhouse, S. (1972)
 Glycolysis, Respiration and Anomalous Gene Expression in Experimental Hepatoma: G.H.A. Clowes Memorial Lecture.
 Cancer Research 32, 3007-3016
338. Wertz, A.W., Lojkin, M.E., Bouchard, B.S. & Derby, M.B. (1953)
 Tryptophan-Niacin Relationships in Pregnancy.
 Journal of Nutrition 64, 339-353
339. Whish, W.J.D., Davies, M.I. & Shall, S. (1975)
 Stimulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity by the Anti-Tumor Antibiotic, Streptozotocin.
 Biochemical and Biophysical Research Communications 65, 722-730
340. Williams, B.L. & Wilson, K. (1978)
 in: Praktische Biochemie: Grundlagen und Technik, S. 19-20
 Thieme Verlag, Stuttgart
341. Wintzerith, M., Klein, N., Mandel, M. & Mandel, P. (1961)
 Comparison of Pyridine Nucleotides in the Liver and in Ascites Hepatoma.
 Nature 191, 467-469
342. Witholt, B. (1971)
 A Bioautographic Procedure for Detecting TPN, DPN, NMN and NR.
 Methods in Enzymology 18, 813-816
343. Yamada, K., Nonaka, K., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Toyoshima, H. & Tarui, S. (1983)
 Preventive Therapeutic Effects of Large-Dose Nicotinamide Injections on Diabetes Associated with Insulinitis. An Observation in Nonobese Diabetic (NOD) Mice.
 Diabetes 31, 749-753
344. Yamada, M., Nago, M., Hidaka, T. & Sugimura, T. (1973)
 Effect of Poly(ADP-Ribose) Formation on DNA Synthesis and DNA Fragmentation in Nuclei of Rat Liver and Rat Ascites Hepatoma AH-130 Cells.
 Biochemical and Biophysical Research Communications 54, 1567-1572

345. Yanokura, M., Horii, M. & Tsukada, K. (1983)
Studies on the Activities of Some Methyltransferases in the Livers and Tumor Cells from Tumor-Bearing Mice.
Life Sciences 32, 2843-2848
346. Yanokura, M. & Tsukada, K. (1982)
Decreased Activities of Glycine and Guanidinoacetate Methyltransferase and Increased Levels of Creatine in Tumor Cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications 104, 1464-1469
347. Yoshida, T. (1957)
Studien über das Ascites-Hepatom.
Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin 330, 85-105
348. Yoshida, T. (1971)
Comparative Studies of Ascites Hepatomas.
Methods in Cancer Research 6, 97-156
349. Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P. & Ciotti, M.M. (1954)
The Isolation and Properties of the Isonicotinic Acid Hydrazide Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide.
Journal of Biological Chemistry 209, 467-484
350. Zelinski, V.G. (1966)
Nicotinamide Methylation in Liver Slices of Rats Irradiated with X-Rays.
Ukrains'kyj biochimicnyj zurnal 38, 539-542
351. Zwilling, E. & de Bell, J.T. (1950)
Micromelia and Growth Retardations as Independent Effects of Sulfanilamide in Chick Embryos.
Journal of Experimental Zoology 115, 59-81
352. Zwelling, L.A., Kerring, D. & Pommier, Y. (1982)
Inhibitors of Poly-(Adenosinediphosphoribose)synthesis Slow the Resealing Rate of X-Ray-Induced DNA Strand Breaks.
Biochemical and Biophysical Research Communications 104, 897-902

7. DANKSAGUNGEN

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. H. Kröger und Herrn Dr. J. Hoshino, in dessen Labor ich die Experimente durchführte, ganz herzlich für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik während der Arbeit. Beider Aufgeschlossenheit ermöglichte es mir, eigene Ideen und Vorstellungen bei der Versuchsplanung und -durchführung einzubringen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Reutter und Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Tauber vom Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin, die mir freundlicherweise die Ratten mit den Morris Hepatomen 9121 und 7777 zur Verfügung gestellt hatten.

Frau B. Hesse und Herrn H. Lörke vom Institut für experimentelle Pathologie am deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, die für mich die übrigen Rattenhepatome transplantierten, bin ich für ihre Kooperation dankbar verbunden.

Dank gebührt Frau M. Herbig, die mir eine ausgezeichnete technische Anleitung zur Züchtung der RLC-Zellen gab, und Frau A. Dietrich, die mir bei der Transplantation der Ascitestumoren und bei der Tierpflege behilflich war.

Zu besonderem Dank bin ich Frau R. Sprengel verpflichtet, die die sehr umfangreichen Schreivarbeiten für das Manuskript dieser Arbeit übernahm.

Frau C.-M. Schmidt sei für die sorgfältige Anfertigung der Zeichnungen gebührend gedankt.

8. LEBENSLAUF

Roland Seifert

- 05.12.1960 geboren als Sohn des Industriekaufmannes Jürgen Seifert und seiner Ehefrau Brigitte geb. Röglin, in Berlin-Hermsdorf
- 1967 - 1973 Besuch der Grundschule am Tegelschen Ort in Berlin-Tegelort
- 1973 - 1979 Besuch des Humboldt-Gymnasiums in Berlin-Tegel mit Abschluß Abitur am 29.06.1979
- 01.10.1979 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- 01.01.1982 Beginn der Forschungsarbeiten für die Dissertation am Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes in der Abteilung für Biochemie (Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Kröger)
- 01.03.1983 Aufnahme als Stipendiat in die Studienstiftung des deutschen Volkes
- 19.12.1985 Abschluß des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität mit bestandenem Staatsexamen
- 20.12.1985 Erteilung der Approbation
- 01.01.1986 Beginn der Weiterbildung zum Arzt für Pharmakologie durch Einstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie der Freien Universität Berlin, Universitätsklinikum Charlottenburg (Direktor: Prof. Dr. med. Günter Schultz)

