

**RAINER H. MICHAEL, PETER P. JAROS
UND AXEL WILLIG**

*Die Beteiligung von Calmodulin an der Proliferation
normaler und Tumorzellen unter besonderer Berücksichtigung
von Milzfaktoren*

I Einleitung

Das Calcium-bindende Modulatorprotein Calmodulin (CaM) wurde Anfang der 70er Jahre von W.Y. Cheung eher zufällig entdeckt, als er versuchte, die cAMP-Phosphodiesterase (PDE) aus Rinderhirn zu reinigen und nach einer Ionenaustausch-Chromatografie Aktivitätsverluste feststellte. Durch Zugabe des Homogenats konnte die PDE-Aktivität wieder hergestellt werden, woraus Cheung folgerte, daß ein Regulator existieren müßte, der durch die Chromatografie von dem Enzym getrennt wurde. Fast gleichzeitig veröffentlichten dann Cheung und die Arbeitsgruppe um Kakiuchi ihre Forschungsergebnisse, die das Vorhandensein dieses Regulators bewiesen (Cheung, 1970; Kakiuchi u. Yamazaki, 1970). Nur wenige Jahre später gelang es dann Teo und Mitarbeitern, dieses Aktivatorprotein zu isolieren und zu reinigen (Teo et al. 1973). Noch im gleichen Jahr konnte dann gezeigt werden, daß die Aktivierung der cAMP-PDE Calcium-abhängig ist und der Aktivator Calcium-Ionen bindet (Teo u. Wang, 1973). Aufgrund dieser Calcium-abhängigen Modulatoreigenschaften gaben Cheung et al. (1978) dem Aktivator den Namen Calmodulin. Die nun von vielen Arbeitsgruppen an unterschiedlichsten Geweben und Spezies durchgeführten Untersuchungen über das Vorhandensein dieses Proteins führten zu dem Ergebnis, daß Calmodulin ein im Eukaryoten-Reich ubiquitäres Protein ist. Die daraufhin vorgenommenen

Aminosäure-Analysen belegten darüber hinaus, daß es ein extrem konservatives Protein ist (Reviews: Klee u. Vanaman 1982; Van Eldik u. Watterson, 1985). Aufgrund dieser Ergebnisse deutet sich schon eine Schlüsselposition dieses Moleküls in der zellulären Regulation an. Tatsächlich ist CaM als Regulator an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wozu unter anderem die Wechselwirkungen mit dem second-messenger-System des cAMP, der Einfluß auf den Glykogenstoffwechsel, die Beteiligung am Aufbau des Cytoskeletts und der Zellmotilität (Reviews: Cheung 1980; Means u. Dedman 1980; Cheung 1982; Means et al. 1982b; Klee u. Vanaman 1982; Carafoli u. Penniston 1986) sowie die Regulation der Mitose und Zellproliferation (Review: Whitfield et al. 1987) gehören. Die folgende Zusammenfassung gibt einen Überblick zur Regulation der Zellteilung und Tumorentwicklung, sowie der Beteiligung von CaM an diesen Prozessen.

2 *Der Zell-Zyklus*

Die klassische Cytologie unterteilt den Zellzyklus in G₁-Phase, S-Phase (in der die DNA-Synthese erfolgt), G₂-Phase und schließlich die M-Phase, in der die Mitose stattfindet. Nach der M-Phase können die Zellen dann entweder wieder mit einem neuen Zellzyklus in der G₁-Phase beginnen, oder aber in die G₀-Phase eintreten (Abb. 1). Ausdifferenzierte und nicht in Teilung befindliche Zellen sind in der sogenannten G₀-Phase. Sie haben den Zellzyklus verlassen, in den sie aber oftmals durch ein bestimmtes Signal (bspw. einen Wachstumsfaktor) wieder eintreten können. Eine physiologische Regulation der Zellproliferation kann nur in der G₁-Phase erfolgen. Zu einem späteren Zeitpunkt kann das Fortschreiten des Zellzyklus nicht mehr unterbrochen werden. Nach Untersuchungen von Whitfield und Mitarbeitern (1987) läßt sich die G₁-Phase ihrerseits in drei Unterstadien

einteilen, die als Initiationsphase, Transkriptionsphase und Translationsphase bezeichnet werden (Abb. 2).

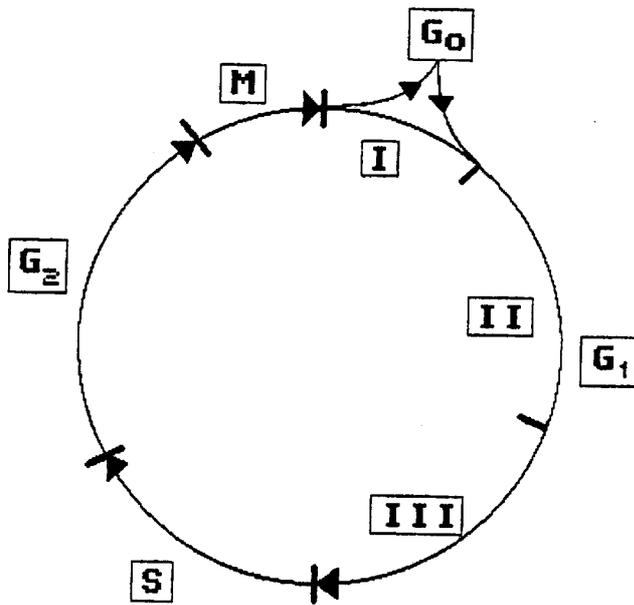


Abb. 1

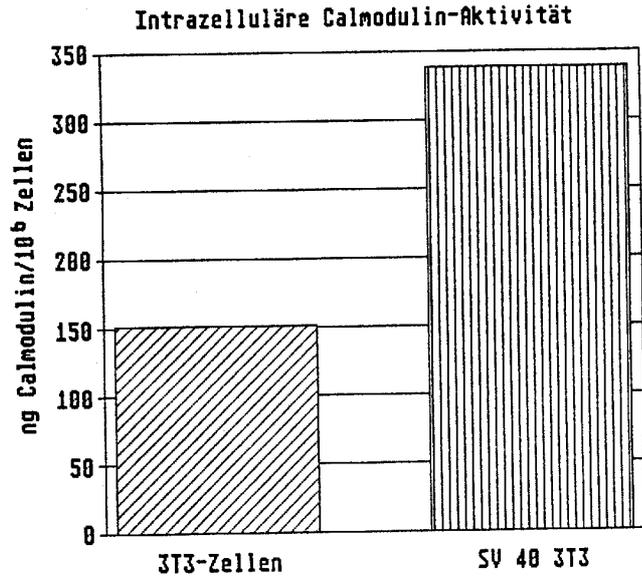


Abb. 2

2.1. Die Initiationsphase (G_1 -I)

Stadium I kann als Initiation der Proliferation bezeichnet werden und dient hauptsächlich der Aktivierung spezifischer Gene, welche die DNA-Synthese einleiten. Es ist gekennzeichnet durch erhöhte cAMP- und Ca^{2+} -Konzentrationen, sowie durch einen erhöhten intrazellulären pH-Wert. Wachstumsfaktoren vom Typ des Platelet-Derived-Growth-Factors (PDGF) initiieren dieses Stadium, indem sie ihren Rezeptor in der Zellmembran aktivieren, der dann an ein G-Protein bindet und dadurch die Phospholipase C aktiviert. Dadurch wird das Membranlipid Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2) gespalten in Diacylglycerin (DG) und Inositoltriphosphat (IP_3). IP_3 öffnet Ca^{2+} -Kanäle im endoplasmatischen

Retikulum und DG aktiviert die Proteinkinase C, die u.a. das G₁-Protein (Inhibitor-Protein) der Adenylatcyclase durch Phosphorylierung inaktiviert und dadurch zu dem erhöhten cAMP-Level beiträgt. Zugleich aktiviert sie auch den Natrium-Protonenaustauscher und erhöht so den intrazellulären pH-Wert. Dies führt zur Stimulierung der Protein-Synthese, sowie zu einer Affinitätserhöhung Ca²⁺-bindender Proteine (CaBP). Außerdem phosphoryliert die Proteinkinase C die Histone H2B u. H4 und führt so zur Kondensation des Chromatins. Das Histon H1 wird durch cAMP-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert. Die Proteinkinase C aktiviert außerdem die Topoisomerase II, welche die Gen-Expression fördert. Durch die Aktivierung von Methyltransferasen ist auch das durch den Ca²⁺-Einstrom aktivierte CaM direkt an der Genregulation beteiligt. Zu den ersten auf diese Art aktivierten Genen gehören die Protoonkogene c-myc und c-fos, die beide für Kernproteine codieren, die DNA-Bindungseigenschaften besitzen. Sie sollen spezifische DNA-Sequenzen erkennen und weitere Proliferations-Gene aktivieren. So induziert das 58 kDa-Protein des c-myc-Gens die Expression der Ornithin-Decarboxylase, des Schlüsselenzyms für die Polyamin-Synthese (Beitrag v. Rothe et al.). Bei Lymphozyten wird das Gen für den Interleukin 2-Rezeptor auf diese Art aktiviert. Experimentell kann durch Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels mit dem Ionophor A 23187 die Glykolyse und der intrazelluläre pH-Wert erhöht und c-myc und c-fos bei Lymphozyten aktiviert werden. Zudem aktiviert der Ca²⁺-Einstrom den Glucose-Transporter in der Zellmembran. Eine Aktivierung der Proteinkinase C durch Behandlung mit Phorbolestern (bspw. mit dem Tumorpromotor TPA oder DG erhöht ebenfalls die Glykolyse, den intrazellulären pH-Wert und aktiviert c-myc und c-fos. Beide Behandlungen für sich alleine wirken aber nicht mitogen. Dieses erste Signal, z. B. durch PDGF, vermag die Zellen nicht über Stadium I hinaus zu bringen. Neben diesen Initiati-

onsfaktoren sind demnach zusätzlich noch Progressionsfaktoren erforderlich.

2.2. Die Transkriptionsphase (G_1 -II)

Stadium II ist die Phase der RNA-Synthese für die in der S-Phase benötigten Proteine. Durch Behandlung mit dem Transkriptionshemmstoff Actinomycin D werden die Zellen in Stadium II arretiert. Es erfolgt ein erneuter cAMP-Peak und die cAMP-Proteinkinasen I + II zeigen erhöhte Aktivitäten. Die Ca^{2+} -Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum ist gesteigert und der intrazelluläre pH-Wert sinkt wieder. Dieses ist auch das Stadium, in dem einige Zellen wie bspw. BALB/c 3T3 auf die Substratverankerung angewiesen sind. Das Protoonkogen K-ras wird verstärkt transkribiert. Es codiert für G-Proteine, die am PIP_2 -Signal und an der Adenylat-Cyclase-Aktivität beteiligt sind.

2.3. Die Translationsphase (G_1 -III)

Das Hauptcharakteristikum des Stadiums III ist seine Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. So öffnet z. B. bei Lymphozyten Interleukin-2 Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran. Durch das Ionophor A 23187 kann die Interleukin-2-Wirkung imitiert werden. Durch Ca^{2+} -Entzug lassen sich daher Zellen in Kultur reversibel in Stadium III arretieren. Ca^{2+} -Zugabe führt dann innerhalb von 15 Minuten bis zu 2 Stunden zur DNA-Replikation. Die gleiche Wirkung kann durch Arachidonsäure und ihre Derivate, wie Prostaglandine erzielt werden, jedoch auch durch Ca^{2+} -CaM, cAMP, TPA und Saccharin. Die beiden letztgenannten sind Aktivatoren der Proteinkinase C. Man kann dieses Stadium als Translationsphase der für die DNA-Synthese erforderlichen Proteine, wie bspw. DNA-Polymerasen und Histone, bezeichnen. So ist dieses Stadium insensitiv für Actinomycin D, aber sensibel für den Translations-Inhibitor Cycloheximid. Die Zugabe von Ca^{2+} nach Ca^{2+} -Entzug hat deshalb in

Gegenwart von Cycloheximid keinen Effekt. Außerdem konnte in diesem Stadium ein erhöhter Transport von Aminosäuren durch die Plasmamembran festgestellt werden. Durch den Ca^{2+} -Einstrom wird abermals CaM aktiviert. Durch die Ca^{2+} -CaM stimulierte cAMP-PDE fällt die cAMP-Konzentration und ebenso die cAMP-Proteinkinase-Aktivität. Das Schlüsselenzym für die Produktion der bei der DNA-Synthese erforderlichen Deoxyribonukleotide ist die Ribonukleotid-Reduktase, die NADPH als Co-Enzym benötigt. Ca^{2+} -CaM aktiviert die NAD-Kinase, die das erforderliche NADPH liefert. Außerdem aktiviert es auch die DNA-Polymerase. Ca^{2+} -CaM-abhängige Phosphatasen aktivieren Translations-Initiationsfaktoren und die Aminoacyl-tRNA-Synthetase. CaM-aktivierbare Proteinkinasen aktivieren das ribosomale S6-Protein. Schließlich aktiviert Ca^{2+} -CaM auch die Myosin-Light-Chain-Kinase und ist so an der Translokation von Replikationsenzymen vom Syntheseort im Cytoplasma zum Nukleus beteiligt. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Stadiums III kann durch TPA oder K-ras reduziert, jedoch nicht eliminiert werden, so daß auch hier ein Zusammenspiel von Proteinkinase C und CaM zu vermuten ist.

2.4. Die S-Phase

Auf die S-Phase, in der die DNA-Replikation erfolgt soll hier nicht näher eingegangen werden.

2.5. Die G_2 -Phase

In der G_2 -Phase kommt es erneut zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration. Es werden Mitose-Promotor-Faktoren (MPF) translatiert, deren mRNA in Stadium III produziert wurde. Sie binden an Chromosomen, fördern deren Kondensation und den Abbau der Kernmembran.

2.6. Die M-Phase

Die Mitose-Phase ist in besonderem Maße von der Ca^{2+} -Steuerung abhängig. Sie kann jedoch nicht durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst werden. Die Ca^{2+} -Versorgung erfolgt allein durch intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher, bspw. das endoplasmatische Retikulum, das in Stadium II aufgefüllt wurde. Ein MPF phosphoryliert die Histone H1 und H3, und induziert die Chromosomen-Kondensation. Die Ca^{2+} -vermittelte Phosphorylierung kann durch den CaM-Inhibitor W7 (ein Naphtalin-Sulfonamid) verhindert werden. Ca-CaM bewirkt die Depolymerisation des Tubulins am Ende der Spindel-Pole und sorgt so für die Bewegung der Chromosomen während der Anaphase. Gegen Ende der Mitose sorgen Phosphatasen, die Histone dephosphorylieren und die MPF's inaktivieren für die Dekondensation der Chromosomen. Schließlich reguliert Ca-CaM auch die Cytokinese, indem es die Kontraktion der Akto-Myosin-Fibrillen reguliert, welche die Einschnürung der Zelle und die Aufteilung in zwei Tochterzellen zur Folge hat (Review: Whitfield et al., 1987).

3 Calmodulin und Krebs

Hauptcharakteristika von krebsartig transformierten Zellen ist u.a. ihr unkontrolliertes Wachstum und ihre partielle Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren. Andere Merkmale sind u.a. der Verlust der Substratverankerung am Ende der G_1 -Phase, Veränderungen des Cytoskeletts und der Glykocalyx. Daß CaM an diesen Prozessen in vielfältiger Weise beteiligt ist, wurde bereits ausgeführt. Zahlreiche Hinweise belegen ebenfalls seine Beteiligung an der Transformation (Review: Veigl et al., 1984)

3.1. Mechanismen der neoplastischen Transformation

Eine Möglichkeit für Zellen, die Proliferationskontrolle zu umgehen, besteht darin, ihre eigenen Wachstumsfaktoren zu

produzieren. Ein Beispiel für diese autokrine Stimulation ist das Produkt des sis-Onkogens, das im Simian Sarcoma Virus nachgewiesen wurde. Es codiert für einen PDGF-ähnlichen Wachstumsfaktor. Das Protoonkogen c-sis ist in menschlichen Osteosarkomen und Glioblastomen aktiviert. Allerdings reicht eine persistente autokrine Stimulation allein für eine neoplastische Transformation nicht aus. Es ist eine präneoplastische Veränderung, die die Zellen hindert, in die nicht proliferative G_0 -Phase zu gehen. Eine andere Möglichkeit, wie Zellen sich der Kontrolle durch externe Wachstums-signale entziehen können, ist die Produktion von Rezeptor-Komponenten wie Tyrosin-Proteinkinasen (Tyr-PK), die ohne regulatorische Ligand-Bindungs-Domäne ständig aktiv sind. Beispiele hierfür sind die Produkte der Onkogene v-abl (Abelson Murine Leukemia Virus), v-src (Rous Sarcoma Virus), v-erbB (Avian Erythroblastosis Virus) und v-fms (Feline Sarcoma Virus). Die Tyr-PK des Protoonkogens c-abl wird von chronischen myeloiden Leukämiezellen produziert. Die Tyr-PK des v-src ist ein Membranprotein, daß Inositol phosphorylierende Enzyme aktiviert und möglicherweise auch die Proteinkinase C aktiviert. Das v-erbB-Gen codiert für die Tyr-PK-Domäne des EGF-Rezeptors (Epidermal Growth Factor). Es stimuliert den PIP_2 -Abbau, öffnet Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran und stimuliert c-myc. Schließlich erniedrigt es die benötigte Menge an externem Ca^{2+} , die normale Zellen für die G_1/S -Transition benötigen, auf den sehr niedrigen Level, der für viele neoplastische Zellen charakteristisch ist, und initiiert die DNA-Synthese bei durch Ca^{2+} -Entzug in G_1 -III blockierten Zellen. Eine dritte Möglichkeit ist die Insertion dauerhaft aktiver GTP-bindender Proteine in die Plasmamembran. Diesen Weg gehen möglicherweise 20 % aller humanen Tumore. Beispiele hierfür sind Proteine der ras-Onkogene vom Harvey und Kirsten Murine Sarcoma Virus. Das K-ras Protein induziert den PIP_2 -Abbau, stimuliert die Adenylat-Cyclase und reduziert die Ca^{2+} -Abhängigkeit von BALB/c 3T3- und NRK-

Zellen. Das H-ras Protein stimuliert mit Progesteron die Oozyten-Reifung bei *Xenopus*, ein Prozeß, der erhöhten Ca^{2+} -Influx erfordert. So öffnen K-ras und H-ras auch Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran. Außerdem ist bekannt, daß ras-Proteine bei *Saccharomyces cerevisiae* das Chromosomen-Replikations- und Mitoseprogramm starten, ohne Rücksicht auf das Nährstoffangebot. Schließlich können die Zellen auch durch Überproduktion von c-myc den Proliferations-Status aufrechterhalten. Da c-myc normalerweise durch $\text{Ca}^{2+}/\text{PIP}_2$ -Signale induziert wird, führt eine konstitutive Überproduktion zum Verlust der Abhängigkeit von mitogenen Signalen wie PDGF u.a. und sensitiviert die Zellen für Progressionsfaktoren wie EGF, Insulin oder Somatomedin C. Dies geschieht in Maus-Plasmacytoma-Zellen, Burkitt's Lymphom-Zellen, promyelocytischen Leukämie-Zellen und humanen Bronchial-Carcinomen durch Translokation oder Amplifikation von c-myc. Eine zusätzliche zweite Veränderung, wie bspw. ein aktiviertes oder mutiertes ras-Gen, oder permanent aktivierte ras-Produkt Zielgene, die das Chromosomen-Replikations- und Mitoseprogramm starten, befreien die Zellen endgültig vom normalen Kontrollsystem und machen sie endgültig neoplastisch. Polyoma-Viren transformieren ihre Wirtszellen durch die Produktion eines 100 kDa großen T-Antigen genannten Proteins, das die Zellen ähnlich dem c-myc-Produkt im Proliferationsstatus arretiert und eines 56-58 kDa großen mittleren T-Antigen, das an die Plasmamembran bindet und den Transformations-Prozeß abschließt durch seine ras-ähnliche Funktion. Das Avian Leucosis Virus (ALV), das kein Onkogen enthält, inseriert etwas stromaufwärts des c-myc-Gens. Der virale Promotor steigert dessen Expression. Man fand in infizierten Zellen 30-100fach höhere Konzentrationen des RNA-Transkriptes (Veigl et al. 1984; Whitfield et al. 1987).

3.2. Die Beteiligung von Calmodulin an der Transformation

Die vielfältige Beteiligung von CaM an Transformationsvorgängen soll im folgenden aufgezeigt werden (Review: Veigl et al. 1984). Transformierte Zellen haben bis zu 400 % erhöhte Konzentrationen an Ca^{2+} und CaM (s. Abb. 2, S. 82) (Hickie et al. 1983). Sie wachsen auch in Medien mit bis zu 100 % reduzierter Ca^{2+} -Konzentration. CaM-Zugabe induziert die Proliferation in ruhenden Hepatocyten (Hickie et al., 1983). Der CaM-Gehalt in Hepatomzellen korreliert mit zunehmender Wachstumsrate (Wei et al., 1982). CaM-Inhibitoren hemmen die Proliferation (Hidaka et al., 1981). So bspw. das Naphthalin-Sulfonamid W7 in CHO-K1-Zellen (Wei et al., 1982). Die CaM-Antagonisten Trifluoperazin (TFP), W7 und W13 hemmen das Wachstum von humanen Brustkrebszellen (Hickie et al., 1983). Gulino et al., (1986) fanden, daß der Wachstum-inhibierende Effekt von Anti-östrogenen auf humane Brustkrebszellen (MCF-7) gut korreliert ist mit ihrer CaM-hemmenden Aktivität. Die gleiche Wirkung hatte W7 auf das Wachstum von implantiertem soliden Sarkom-180 in Mäusen. Bereits bei einer Dosis von 2 mg/kg/Tag i.p. konnte eine Wachstumshemmung von 73,9 %, sowie eine verlängerte Überlebenszeit erzielt werden. Bei 10 mg/kg/Tag wurde bei 2 von 10 Mäusen eine komplette Regression des Tumors beobachtet. Das nicht chlorierte Derivat W5, das keine CaM-hemmende Aktivität besitzt, hatte bei gleichen Dosen keinen Antitumor-Effekt (Ito u. Hidaka 1983). Humane Leukämie-Zellen (HL 60) differenzieren durch das aktive Vitamin D3 Dihydroxy-Calciferol zu Monocyten. Dieser Prozeß ist korreliert mit der Reduktion der CaM-Konzentration, der Inhibition der DNA-Synthese und einer verminderten Expression von c-myc und c-myb. Hinzu kommt eine gestiegene Proteinkinase C-Aktivität. So kann auch der PK-C aktivierende Phorbolster TPA die Differenzierung induzieren (Brelvi et al., 1986). TPA erhöht auch den 2-Deoxyglucose-Transport (Cochet et al., 1984). Lektine sind

mitogene Stimulatoren für Lymphozyten. Die Behandlung mit Lektinen erhöht den CaM-Gehalt der Zellen, der in Abhängigkeit von der mitogenen Potenz der Lektine zunimmt (Rainteau et al., 1987). Das Ca²⁺-Ionophor A 23187 induziert die Expression von zwei Glucose-regulierten Genen. W7 hat einen antagonistischen Effekt (Resendez et al., 1986). Tumorzellen haben oftmals ein verändertes Glykosilierungsmuster. Streßproteine, die die Protein-Glykosilierung verhindern, werden durch A 23187 induziert (Lee 1987). CaM senkt den Gehalt an Sialinsäure an der Zelloberfläche und ist an der Expression von Fibronectin involviert (Coll et al., 1986). Fibronectin ist beteiligt an der Anheftung von Zellen an ihre Matrix (Kollagen, Fibrin, Heparin usw.) und kommt auf der Oberfläche vieler transformierter Zellen nicht vor. Viele Retroviren enthalten CaM oder ein CaM-ähnliches Ca²⁺-bindendes Protein. CaM-Antagonisten hemmen die Virus-Infektion beim Epstein-Barr-Virus, die Virus-Knospung beim Masern-Virus und die Hämolyse und Zelldiffusion beim Sendai-Virus (Nemerow u. Cooper, 1984; Lewis et al., 1986). Tumorpromotoren reduzieren die Affinität des EGF-Rezeptors für EGF. CaM-Antagonisten senken ebenfalls die EGF-Rezeptor-Affinität (Cochet et al., 1984; Bodine u. Tupper, 1984). CaM ist ein Substrat der von dem Onkogen src codierten Proteinkinase, die Tyrosin-spezifisch ist. In nicht transformierten Zellen kommen nur phosphorylierte Serin- und Threonin-Reste im CaM vor (Nakajo et al., 1986; Fukami et al., 1986). Transformierte Zellen haben - wie bereits erwähnt - ein verändertes Cytoskelett durch Veränderungen des Mikrotubuli-Mikrofilament-Netzwerks und zeigen nur noch verminderte Substratverankerung. Chafouleas und Mitarbeiter (1980) untersuchten 3T3- und SV40-transformierte 3T3-Zellen, sowie NRK- und RSV-transformierte NRK-Zellen auf ihren Gehalt an polymerisierten Mikrotubuli. Während der Gehalt an Tubulin in den jeweiligen Zelllinien gleich war, zeigten die transformierten Zellen einen um 50 %

verminderten Gehalt an polymerisierten Mikrotubuli. Die Depolymerisation der Mikrotubuli ist CaM-abhängig. RSV-transformierte Zellen besitzen nur noch ein Drittel der Caldesmon-Konzentration (Owada et al. 1984). Caldesmon ist ein Protein, daß in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration entweder an CaM oder an Aktin bindet, ein Effekt, der als Flip-Flop-Mechanismus bezeichnet wird. Die Zelldeformation von Erythrozyten ist abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Murakami et al., 1986). Vinkulin, ein Protein, das Aktinfilamente mit der Zellmembran verbindet und für die Substratverankerung verantwortlich ist, ist in HeLa-Zellen Ca^{2+} -sensitiv, nicht aber in normalen Muskelzellen (Weeds, 1982). MacManus und Mitarbeiter beschrieben 1982 ein kleines Ca^{2+} -bindendes Modulatorprotein, das CaM in in-vitro-Tests ersetzen konnte. Da es in vielen Tumorzellen gefunden wurde, anfänglich aber in normalen Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, erhielt es den Namen Oncomodulin (MacManus et al., 1982). Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß dieses Protein in humanen extraembryonalen Geweben und in der Rattenplazenta, aber nicht in Organen der fetalen Ratte vorkommt (MacManus et al., 1987). PDGF- und EGF-Zugabe zu ruhen den humanen Fibroblasten erhöhen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, während Tumorpromotoren (bspw. Phorbolester) und Insulin keinen solchen Effekt haben. Durch Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} kann diese Konzentrationserhöhung nicht verhindert werden, so daß man daraus schließen kann, daß durch diese Wachstumsfaktoren Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, durch vorausgegangene Spaltung von PIP_2 (Moolenaar et al., 1984). Man könnte diese Liste sicherlich noch weiter fortführen, was jedoch den Rahmen dieses Artikels sprengen würde (Review: Veigl et al., 1984). Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß bereits erste Ergebnisse von klinischen Phase I-II Studien mit CaM-Inhibitoren vorliegen. So behandelten Hait und Mitarbeiter 19 vorbehandelte Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen, die kaum noch auf konventionelle

Therapien ansprechen, mit einer kombinierter Therapie von DNA-schädigenden Agentien, wie Bleomycin mit dem CaM-Antagonisten Trifluoperazin. Vier Patienten sprachen auf die Therapie an. Bei dieser Therapie hatte man sich die Erkenntnis zunutze gemacht, daß CaM an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Chafouleas et al. 1984; Pavelic 1987; Rosenthal u. Hait 1988)

4 Der Einfluß von Milzfaktoren auf den Zellzyklus und die Calmodulin-Aktivität

Die vorliegenden Ergebnisse über Wachstumsmodulation durch Milzfaktoren (s. Beitr. v. Dittich et al. u. Rothe et al.) lassen die Annahme gerechtfertigt erscheinen, daß Milzfaktoren über die Beeinflussung Ca^{2+} -modulierter Prozesse an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt sind. Außer der Wirkung der Milzfaktoren wurde vergleichend die Wirkung von Thymosinen, Polyaminen und wachstumsstimulierenden Faktoren untersucht.

4.1 Zellzyklus-Untersuchungen

Zur Analyse des Zellzyklus wurde das Zellwachstum der eingesetzten Zellen durch Serumentzug in der G_0/G_1 -Phase arretiert. Abb. 3 zeigt am Beispiel von V79-Zellen, daß die so behandelten Zellen in die stationäre Phase übergehen, während sich die serumbehandelten Zellen in der logarithmischen Phase befinden. Erneute Serumzugabe läßt die Zellen synchron in neue Zellzyklen eintreten. In Abb. 4 sind die Zykluszeiten für V79-Zellen dargestellt. Sie zeigen in der log-Phase Verdopplungszeiten von 15 Stunden. Die durch Serumentzug arretierten Zellen weisen dagegen Verdopplungszeiten von 100 Stunden und mehr auf. Stimulation mit 5 % foetalem Kälberserum (FCS) induziert bereits nach 24 Stunden Zykluszeiten von 21 Stunden und nach 48 Stunden ist die Zellvermehrung wieder weitgehend normalisiert. Behandlung mit nur 2 % FCS hat nach 48 Stunden eine Ver-

dopplungszeit von 16 Stunden zur Folge. Zusätzliche Gabe von 200 µg des Milzextrakt-Dialysats (M1D) (s. Beitr. v. Dittrich et al.) verringert die Verdopplungszeit auf 14,4 Stunden. Auch das Dialysat M1D allein bewirkt bei synchronisierten Zellen eine Wachstumsstimulation mit einem Zyklus von 23 Stunden. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch bei den langsamer wachsenden, synchronisierten, Virus-transformierten SV40-3T3-Zellen (s. Abb. 5).



Abb. 3

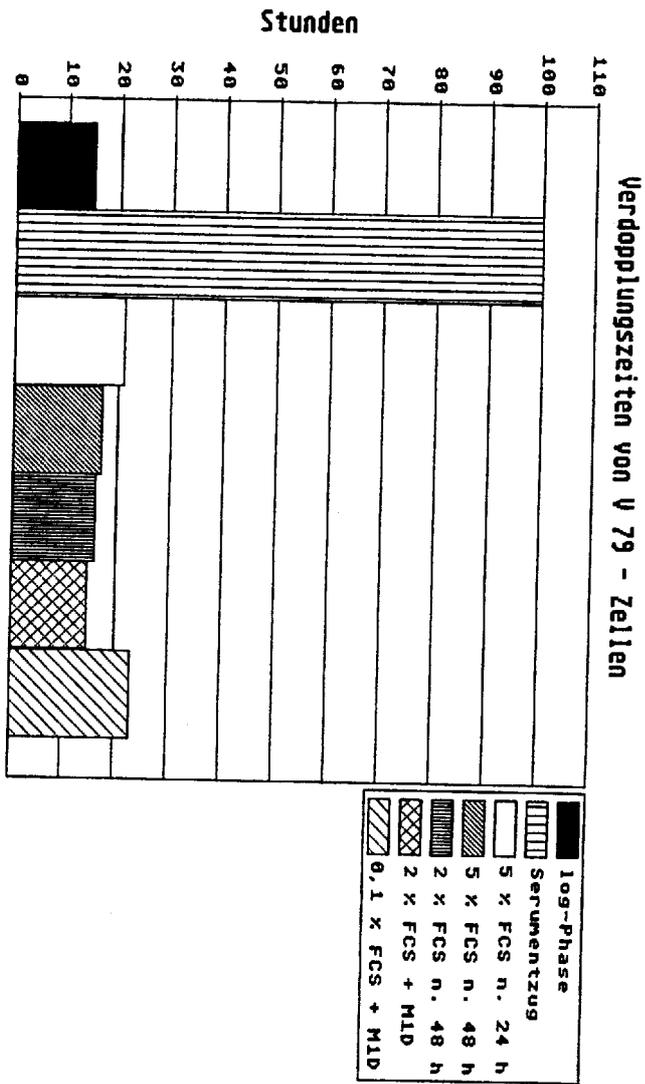


Abb. 4

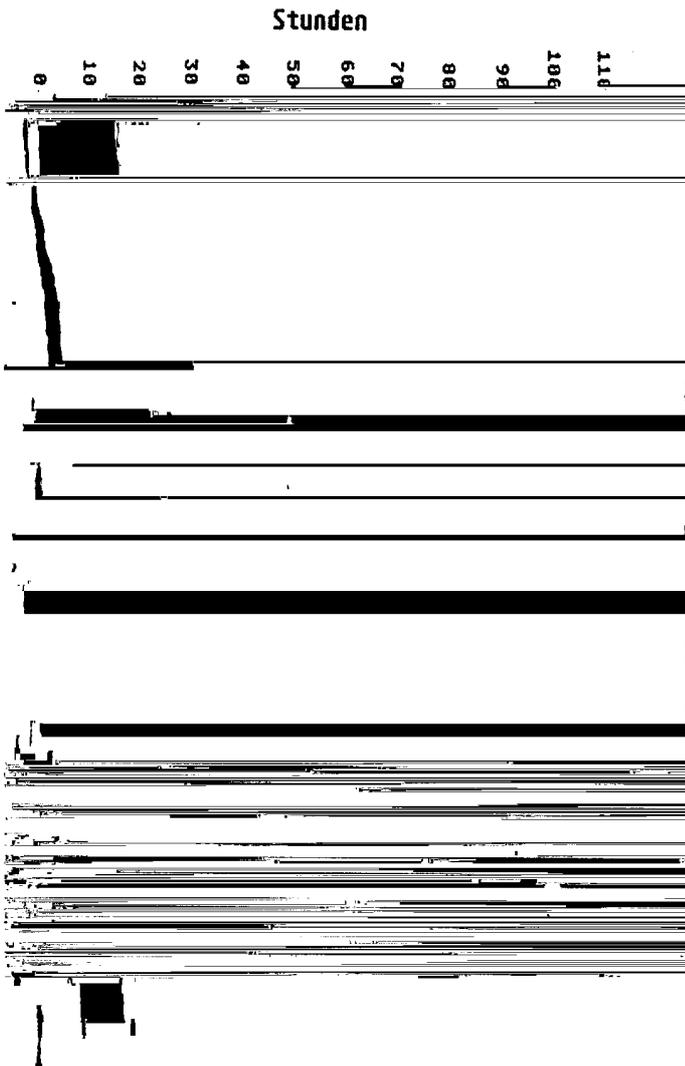


Abb. 5

In der logarithmischen Phase erreichen die Zellen Verdopplungszeiten von 35 Stunden. Nach Serumentzug benötigen die Zellen etwa 100 Stunden zur Verdopplung. Durch Stimulation mit 5 % FCS ist nach 21 Stunden bereits eine Verdopplungszeit von 38,5 Stunden erreicht. Die zusätzliche Gabe von MID (200 µg) oder Spermidin (40 µg) ergab allerdings kaum signifikante Unterschiede. Die Verdopplungszeiten erreichen 30 bzw. 35 Stunden. Allerdings zeigt auch hier das Dialysat MID und auch Spermidin in Abwesenheit von Serum eine Wachstumsstimulation. Die Zykluszeiten wurden mit 37 bzw. 41 Stunden bestimmt.

Um die Dauer der G₁-Phase zu bestimmen, wurde der Beginn sowie die Dauer der S-Phase durch den ³H-Thymidin-Einbau in die DNA ermittelt. Abb. 6 zeigt einen typischen Verlauf am Beispiel von SV40-3T3-Zellen. Die Zellen beginnen etwa 24 h nach Stimulation mit der DNA-Synthese und erreichen das Maximum der ³H-Thymidin-Inkorporation nach 28 h. Aus dem weiteren Kurvenverlauf läßt sich die Dauer der S-Phase mit 8 h abschätzen. Bei einem Gesamtzyklus von 35 h beträgt die G₁-Phase ca. 20 h und die S-Phase 8 h. Für die M-Phase lassen sich 2 h und für die G₂-Phase 5-10 h zu berechnen. Die V79-Zellen beginnen etwa 13 h nach Stimulierung mit der DNA-Synthese (nicht gezeigt) und erreichen nach ca. 19 h ihr Maximum. In den folgenden zwei Stunden ist die Einbaurrate fast wieder auf ihren Ausgangspunkt abgesunken. Auch bei dieser Zelllinie dauert die S-Phase also ca. 8 Stunden. Bei 16 Stunden Verdopplungszeit und zwei Stunden für die M-Phase verbleiben für G₁- und G₂-Phase insgesamt nur noch ca. 6 Stunden.

Sowohl 5 % FCS als auch 200 µg MID ohne FCS stimulieren die DNA-Synthese (Abb. 7). Der nicht dialysierte Milzextrakt M1 zeigt eine deutlich geringere Stimulation, was auf eine Anreicherung des Wachstumsfaktors in MID hinweist.

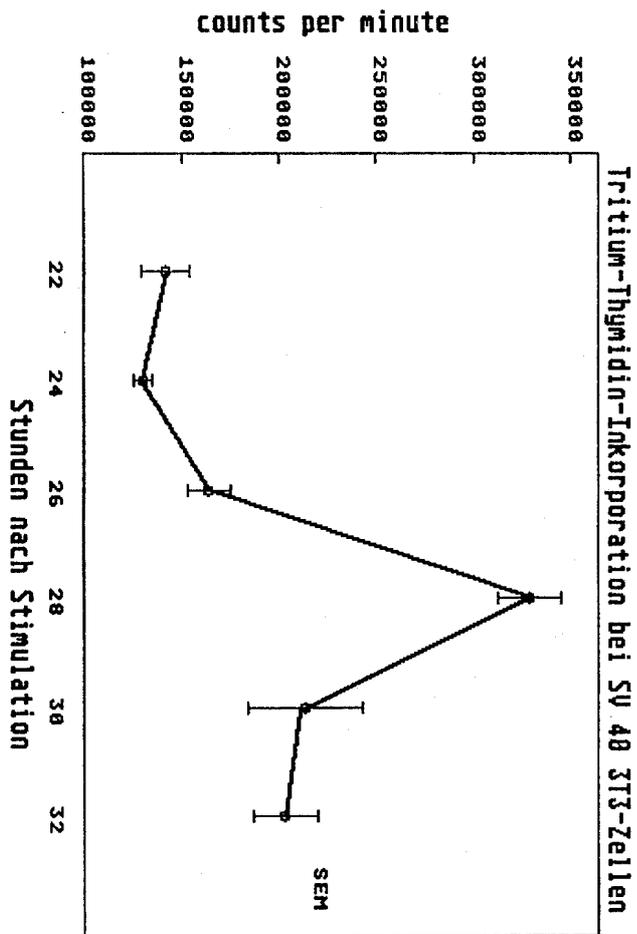


Abb. 6

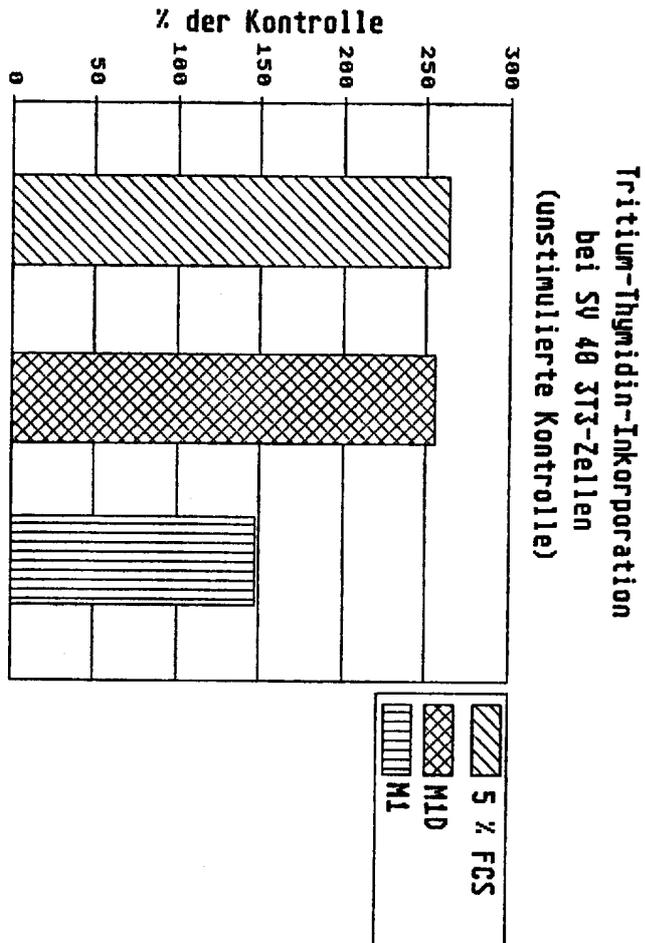


Abb. 7

4.2 *Erste Ergebnisse zum Einfluß von Milzfaktoren auf die intrazelluläre Calmodulin-Aktivität*

Die CaM-Aktivität wurde über die Stimulierung der CaM-abhängigen Phosphodiesterase nach der Methode von Teo et al., (1973) bestimmt. Bei virustransformierten, synchronisierten SV40-3T3-Zellen zeigte sich 21 Stunden nach Stimulation mit 5 % FCS eine Steigerung der intrazellulären CaM-Aktivität auf ca. 255 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb. 8). MID (200 µg) erhöhte die CaM-Aktivität auf ca. 320 % und lag damit deutlich über über der serumstimulierten Kontrolle. MID in Kombination mit 5 % FCS steigerte die CaM-Aktivität auf ca. 345 %, eine weitere kräftige Steigerung im Vergleich zur Stimulation mit Serum allein. Bemerkenswert ist der Befund, daß das Polyamin Spermidin (40 µg) allein eine Steigerung auf 170 %, zusammen mit 5 % FCS jedoch eine Erhöhung auf 430 % ergab, trotz der Tatsache, daß die Anwesenheit von Aminooxydasen im FCS normalerweise H₂O₂-vermittelte zytotoxische Effekte bedingt.

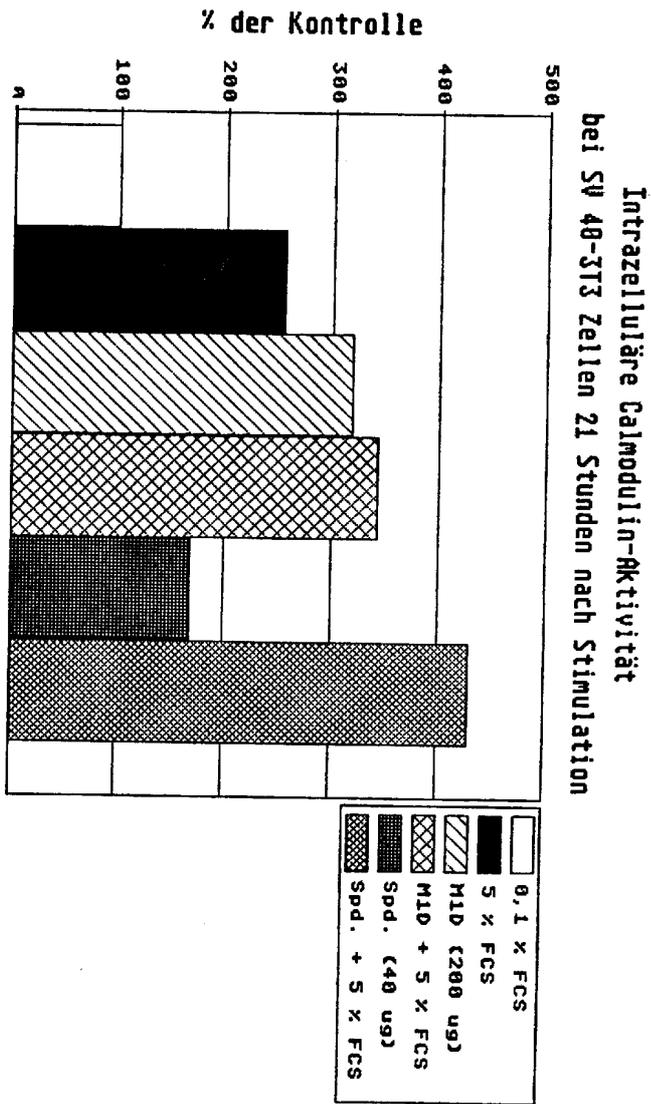
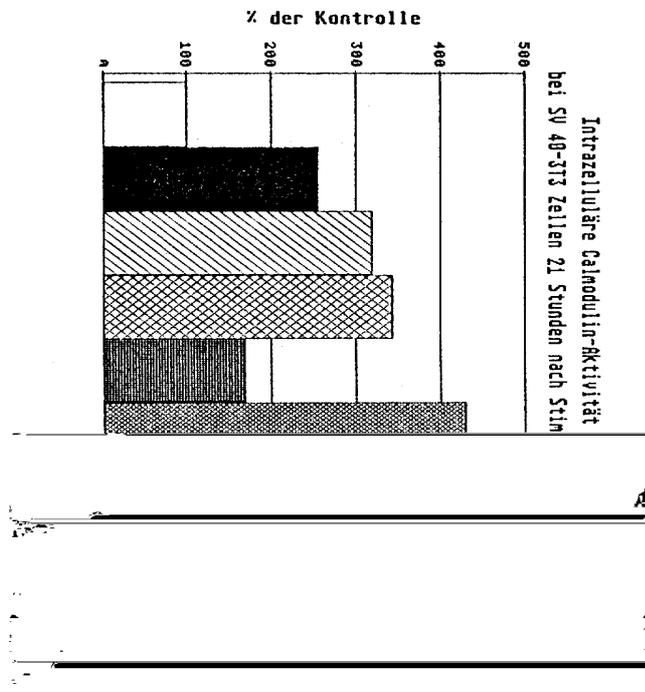
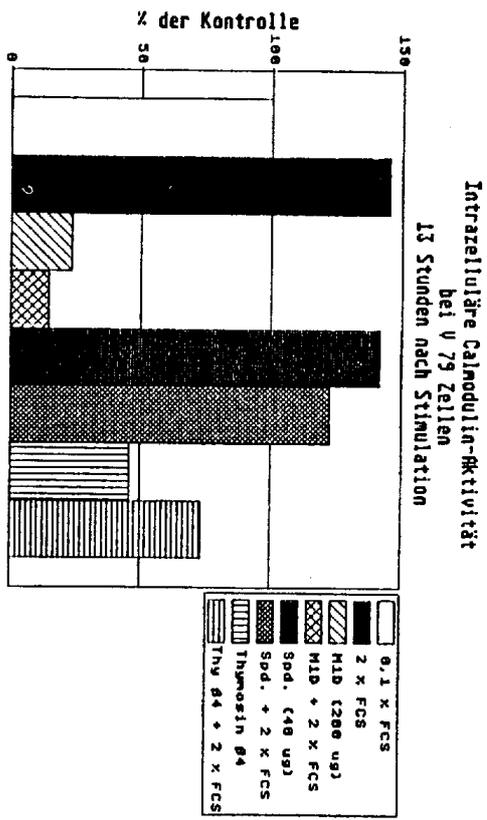


Abb. 8

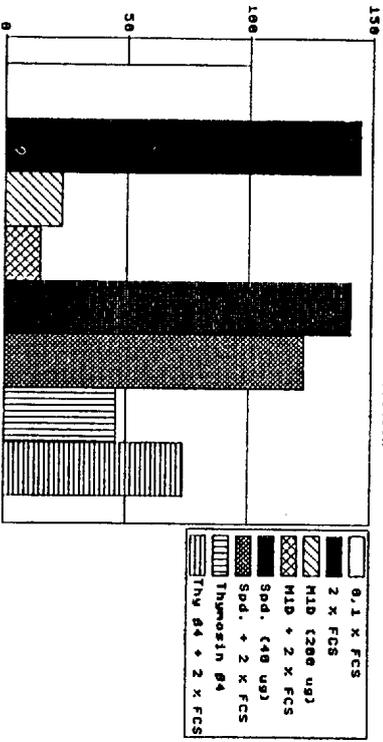
Abbildung 9 zeigt, daß die CaM-Aktivität durch Spermidin nicht nur im Bezug auf die Zellzahl erhöht ist, sondern sich auch bezogen auf den Protein-Gehalt M1D in Gegenwart von 5 % FCS bewirkte im Vergleich zur serumstimulierten Kontrolle eine Aktivierung des CaM auf 175 %. Spermidin plus Serum erhöhte die CaM-Aktivität auf 160 %, während Thymosin- β 4 auch ohne Serum eine Steigerung auf 145 % bewirkte.



Die CaM-Aktivität synchronisierter V79-Zellen erhöhte sich nach Stimulierung mit 2 % FCS nach 13 Stunden auf 146 %. (Abb. 10). Das Dialysat bewirkte hier nun eine Hemmung um 77 %, die sich auch durch gleichzeitige Gabe von 2 % FCS nicht aufheben ließ (ca. 85 % Hemmung). Auch Thymosin- β 4 (2 μ g) hemmte die CaM-Aktivität um ca. 54 %. Auch durch zusätzlich 2 % FCS ließ sich dieser Effekt nicht völlig aufheben (ca. 27 % Hemmung). Bezogen auf die serumstimulierte Kontrolle ergab dies 50 % Hemmung. Durch Spermidin ohne Serum wurde eine Stimulierung auf ca. 142 % erzielt, die durch zusätzliche Gabe von 2 % FCS leicht zurückging (ca. 123 %). Im Vergleich zur serumstimulierten Kontrolle bedeutet dies eine leichte Hemmung um ca. 16 %.



Intrazelluläre Calmodulin-Aktivität
 bei V 79 Zellen
 13 Stunden nach Stimulation



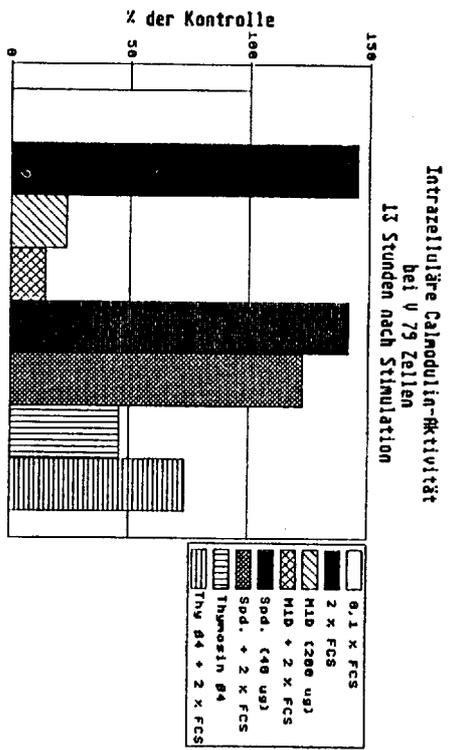


Abb. 10

Ein völlig gegenteiliger Effekt zeigte sich bei V79-Zellen 17 Stunden nach Stimulation (Abb. 11). Das Dialysat ohne Serum ergab hier bereits eine höhere intrazelluläre CaM-Aktivität, als die serumstimulierte Kontrolle (ca. 145 %). Durch zusätzliche Gabe von 2 % FCS wurde eine weitere Stimulierung auf 275 % erzielt. Spermidin bewirkte hier eine Hemmung um 72 %, die auch durch zusätzliche Serumgabe nicht vollständig aufzuheben war (26 %).

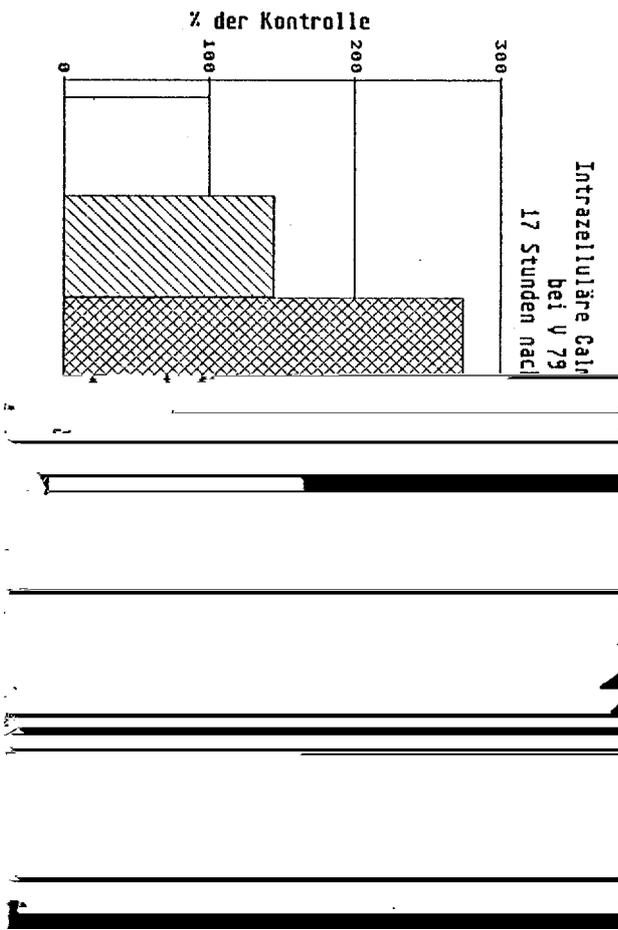


Abb. 11

5 *Diskussion und Ausblick*

Die hier gezeigten Ergebnisse erster Untersuchungen zeigen einen sehr deutlichen zeitabhängigen Effekt von Milzfaktoren auf die intrazelluläre CaM-Aktivität. In weiteren Untersuchungen ist es deshalb erforderlich, eine genaue Zeitkinetik der CaM-Aktivität während der G₁-Phase vorzunehmen.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchen zur Zeit die Wechselwirkungen von Polyaminen mit dem Ca²⁺/CaM-Stoffwechsel, die noch als weitestgehend unverstanden gelten können. So konnten Walters und Johnson (1988) zeigen, daß die Ca²⁺M-abhängigen Enzyme PDE und Calcineurin, eine Phosphatase, durch Spermin Ca²⁺-unabhängig inhibiert werden können. Allerdings waren hierfür Konzentrationen im millimolaren Bereich erforderlich. Kröner (1988) konnte durch Spermin die Ca²⁺-Aufnahme in Rattenleber-Mitochondrien erhöhen, nicht jedoch in Herz-Mitochondrien. Missiaen et al. (1989) fanden durch Polyamine eine Hemmung der Ca²⁺-Pumpe in der Plasmamembran, die sie auf Interaktionen mit dem als zellulärem Boten fungierendem Membranlipid PIP₂ (s. Kapitel 2.1) zurückführten. Spermin zeigte hier einen stärkeren Effekt als Spermidin. Ginty und Seidel (1989) untersuchten die Wachstumsregulation an synchronisierten Zellen. Sie stellten fest, daß durch Serumentzug die Aktivität des Schlüsselenzyms der Polyaminsynthese, die Ornithin-Decarboxylase (ODC) auf Null zurückgeht und die Zellen aufhören zu wachsen. Dadurch kommt es zu einer Verarmung der Zellen an intrazellulären Polyaminen, die für das Wachstum essentiell sind. Durch Serumstimulation wird die ODC-Aktivität wieder erhöht und erreicht etwa vier Stunden nach Stimulation ihr Maximum. Diese Zeit erscheint erforderlich, da die ODC eine extrem kurze Halbwertszeit von 10 - 20 Minuten hat (Jänne et al. 1983), so daß eine Neusynthese des Enzyms erforderlich ist. Das Produkt des durch Wachstumsfaktoren aktivierbaren zellulären Onkogens c-myc aktiviert die Expression des ODC-Gens (Whitfield et

al., 1987), wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären Putrescinkonzentration kommt, die ca. 6-8 Stunden nach Stimulation ihr Maximum erreicht. Nach Behandlung mit dem ODC-Antagonisten Difluormethylornithin (DFMO) stellen die Zellen ihr Wachstum ein. Durch zusätzliche Gabe von 10 mM Putrescin konnte die DFMO-Hemmung aufgehoben werden. In normalem FCS wurden recht hohe Polyamin-Konzentrationen nachgewiesen, die durch Dialyse entfernt werden konnten. Die Autoren vermuteten, daß extrazelluläre Polyamine von den Zellen inkorporiert werden können, und so als Wachstumssubstrat dienen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigt (s. Beitrag Rothe et al.). Da außerdem hohe extrazelluläre Polyaminkonzentrationen die ODC-Aktivität senken, könnte bei Zellen mit einem effektiven Polyamin-Transportsystem ein ODC-unabhängiges Wachstum erfolgen. Außerdem zeigten Ginty und Seidel (1989), daß die ODC-Aktivität CaM-abhängig ist. Sie konnten durch Behandlung mit dem CaM-Antagonisten W-7 eine Hemmung der ODC-Aktivität nachweisen, die mit der wachstumshemmenden Aktivität von W-7 korreliert. Sowohl die Aktivierung der CaM (Whitfield et al. 1987), als auch die der ODC (Jänne et al. 1983) werden als essentiell für den Übergang der Zellen von der G₁- in die S-Phase angesehen. Einige Befunde (Review: Jänne et al. 1983) deuten daraufhin, daß Spermidin das für die Wachstumsregulation erforderliche Polyamin zu sein scheint. So weisen junge und aktiv wachsende Gewebe hohe Polyamin-Konzentrationen auf, vor allem aber an Spermidin. Durch spezifische Hemmung der Spermidin-Synthetase bei Mäusefibroblasten und Hepatomzellen wird die Spermidin-Akkumulation nicht aber die von Putrescin und Spermin verhindert. Die Hemmstoffe besitzen außerdem eine dosisabhängige, wachstumshemmende Aktivität, die durch Spermidin aufgehoben werden kann. Bei Epidermiszellen haben Polyamine generell keinen stimulierenden oder inhibierenden Effekt auf Zellen mit normalem Polyamin-Level. Allerdings soll 10 mM Putrescin die ³H-Thymidin-

Inkorporation verdoppeln und eine Applikation von Putrescin und Spermin, nicht aber von Spermidin, soll die Thymidin-Inkorporation stimulieren.

Neben der entscheidenden Rolle der Polyamine bei der Wachstumsregulation sind sie auch an der Differenzierung beteiligt (Pegg und McCann, 1988). So ist die Differenzierung von Fibroblasten in Fettgewebe mit einem erhöhten Polyamin-Level korreliert, während bei embryonalen Mausearcinomzellen eine Reduktion der Polyamin-Konzentration eine Differenzierung induziert.

So wie die Beteiligung der Polyamine am Krebsgeschehen sich noch schwer in ein einheitliches Konzept bringen läßt (s. Beitr. Rothe et al.) ist die Interaktion mit dem Ca^{2+} /CaM-System teilweise widersprüchlich und zum Teil auch abhängig von der untersuchten Zelllinie. Dennoch weisen die bis heute vorliegenden Untersuchungen und auch diese Arbeit daraufhin, daß gerade kombinierte Untersuchungen des Polyamin-Stoffwechsels und des CaM-Messenger-Systems hinsichtlich der Regulation des Zellwachstums normaler und neoplastischer Zellen das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen erweitern können. Die Arbeiten wurden unterstützt durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie, Nr. 0317056A.

Literatur

- Bodine PV, Tupper JT (1984) Calmodulin antagonists decrease the binding of epidermal growth factor to transformed, but not to normal, human fibroblasts. *Biochem J* 218:629-632
- Brelvi ZS, Christakos S, Studzinski GP (1986) Expression of monocyte-specific oncogenes c-fos and c-fms in HL60 cells treated with vitamin D3 analogs correlates with inhibition of DNA synthesis and reduced calmodulin concentration. *Lab Invest* 55:269-275
- Carafoli E, Penniston JT (1986) Das Calcium-Signal. *Spektrum der Wissenschaft* 1:76-85
- Chafouleas JG, Pardue RL, Brinkley BR, Dedman JR, Means AR (1980) Effect of viral transformation on the intracellular regulation of calmodulin on tubulin. In: Siegel FL, Carafoli E, Kretsinger RH, MacLennan DH, Wasserman RH (Eds) *Calcium-binding proteins: Structure and function*. Elsevier North Holland Inc., New York, pp 189-196
- Chafouleas JG, Bolton WE, Means AR (1984) Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: A role for calmodulin in DNA repair. *Science* 224:1346-1348
- Cheung WY (1970) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Com* 38:533-538
- Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19-27
- Cheung WY (1982) Calmodulin - Schlüsselfigur im Zellgeschehen. *Spektrum der Wissenschaft* 8:36-45
- Cheung WY, Lynch TJ, Wallace RW (1978) *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9:233-251 nach: Klee u. Vanaman, 1982

-
- Cochet C, Gill GN, Meisenhelder J, Cooper JA, Hunter T (1984) C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 249:2553-2558
- Coll MJ, Serratos J, Bachs O, Gahmberg CG, Enrich C (1986) Calmodulin may decrease cell surface sialic acid and be involved in the expression of fibronectin during liver regeneration. *FEBS Letters* 208:418-422
- Eldik van LJ, Watterson DM (1985) Calmodulin structure and function. In: Marme D (ed) *Calcium and cell physiology*. Springer, Berlin, pp 105-124
- Fukami Y, Nakamura T, Nakayama A, Kanehisa T (1986) Phosphorylation of tyrosine residues of calmodulin in Rous sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4190-4193
- Ginty DD, Seidel ER (1989) Polyamine-dependent growth and calmodulin-regulated induction of ornithine decarboxylase. *J Physiol* 256:G342-G348
- Gulino A, Barrera G, Vacca A, Farina A, Ferriti C, Screpanti I, Dianzani MU, Frati L (1986) Calmodulin antagonism and growth-inhibiting activity of triphenylethylene antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 46:6274-6278
- Hait WN (1987) Targeting calmodulin for the development of novel cancer chemotherapeutic agents. *Anti-Cancer Drug Design* 2:139-149
- Hickie RA, Wei JW, Blyth LM, Wong DYW (1983) Cations and calmodulin in normal and neoplastic cell growth regulation. *Can J Biochem Cell Biol* 61:934-941
- Hidaka H, Sasaki Y, Tanaka T, Endo T, Ohno S, Fuji Y, Nagata T (1981) N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits

cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4354-4357

- Ito H, Hidaka H (1983) Antitumor effects of a calmodulin antagonist on the growth of solid sarcoma-180. *Cancer Letters* 19:215-220 Jänne J, Höltä E, Kallio A, Käpyaho K (1983) Role of polyamines and their antimetabolites in clinical medicine. In: *Special topics in endocrinology and metabolism*. Alan R Liss, New York, 5:227-293
- Kakiuchi S, Yamazaki R (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor from brain. *Biochem Biophys Res Comm* 41:1104-1110
- Klee CB, Vanaman TC (1982) Calmodulin. *Adv Prot Chem* 35:213-321 Lee S (1987) Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *TIBS* 12:20-23
- Kröner H (1988) Spermine, another specific allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 267:205-210
- Lewis MG, Chang JY, Olsen RG, Fertel RH (1986) Identification of calmodulin activity in purified retroviruses. *Biochem Biophys Res Comm* 141:1077-1083, 1986
- MacManus JP, Whitfield JF, Boynton AL, Durkin JP, Swierenga SHH (1982) Oncomodulin - A widely distributed, tumour-specific, calcium-binding protein. *Oncodev Biol Med* 3:79-90
- MacManus JP, Brewer LM, Gillen MF (1987) Oncomodulin - an oncodevelopmental calcium-binding protein. In: Anghileri (ed) *The role of calcium in biological systems*. CRC Press, Baton Rouge, Vol IV A,
- Means AR, Dedman JR (1980) Calmodulin - an intracellular calcium receptor. *Nature* 285:73-77 Means AR, Tash JS, Chafouleas JG (1982) Physiological implications of

the presence, distribution, and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiological Reviews* 62:1-39

- Missiaen L, Wuytack F, Raeymaekers L, Smedt de H, Caesteels R (1989) Polyamines and neomycin inhibit the purified plasma-membrane Ca^{2+} pump by interacting with associated polyphosphoinositides. *Biochem J* 261:1055-1058
- Moolenaar WH, Tertoolen LGJ, Laaf de SW (1984) Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca^{2+} in human fibroblasts. *J Biol Chem* 259:8066-8069
- Murakami J, Maeda N, Kon K, Shiga T (1986) A contribution of calmodulin to cellular deformability of calcium-loaded human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 863:23-32
- Nakajo S, Hyashi K, Daimatsu T, Tanaka M, Nakaya K, Nakamura Y (1986) Phosphorylation of rat brain calmodulin in vivo and in vitro. *Biochem Int* 13:687-693
- Nemerow GR, Cooper NR (1984) Infection of B lymphocytes by a human herpesvirus, Epstein-Barr virus, is blocked by calmodulin antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4955-4959
- Owada MK, Hakura A, Iida K, Yahara I, Sobue K, Kakiuchi S (1984) Occurrence of caldesmon (a calmodulin binding protein) in cultured cells: Comparison of normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3133-3137
- Pavelic K (1987) Calmodulin antagonist W 13 prevents DNA repair after bleomycin treatment of human urological tumor cells growing on extracellular matrix. In *J Biochem* 19:1091-1095
- Pegg AE, McCann PP (1988) Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 11-18

- Rainteau D, Sharif A, Bourillon R, Weinman S (1987) Calmodulin in lymphocyte mitogenic stimulation and in lymphoid cell line growth. *Exp Cell Res* 168:546-554
- Resendez E Jr, Ting J, Kim KS, Wooden SK, Lee AS (1986) Calcium ionophore A 23187 as a regulator of gene expression in mammalian cells. *J Cell Biol* 103:2145-2152
- Rosenthal SA, Hait WN (1988) Potentiation of DNA damage and cytotoxicity by calmodulin antagonists. *Yale J Biol Med* 61:39-49
- Teo TS, Wang JH (1973) Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca^{2+} binding protein. *J Biol Chem* 248:5950-5955
- Teo TS, Wang TH, Wang JH (1973) Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *J Biol Chem* 248:588-595
- Veigl ML, Vanaman TC, Sedwick WD (1984) Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. *Biochim Biophys Acta* 738:21-48
- Walters JD, Johnson JD (1988) Inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase and calcineurin by spermine, a calcium-independent calmodulin antagonist. *Biochim Biophys Acta* 957:138-142
- Weeds A (1982) Actin-binding proteins - regulators of cell architecture and motility. *Nature* 296:811-816
- Wei JW, Morris HP, Hickie RA (1982) Positive correlation between calmodulin content and hepatoma growth rates. *Cancer Res* 42:2571-2574
- Whitfield JF, Durkin JP, Franks DJ, Kleine LP, Raptis L, Rixon RH, Sikorska M, Walker PR (1987) Calcium, cyclic AMP and protein kinase C - Partners in mitogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 5:205-250

