

Oldenburger Universitätsreden

Ansprachen • Aufsätze • Vorträge

herausgegeben von
Friedrich W. Busch und Hermann Havekost

In der Reihe *Oldenburger Universitätsreden* werden unveröffentlichte Vorträge und kürzere wissenschaftliche Abhandlungen Oldenburger Wissenschaftler und Gäste der Universität sowie Reden und Ansprachen, die aus aktuellem Anlaß gehalten werden, publiziert.

Die *Oldenburger Universitätsreden* werden in Verbindung mit dem Wissenschaftlichen Beirat der Schriftenreihe der Universität Oldenburg herausgegeben von Prof. Dr. Friedrich W. Busch, Institut für Erziehungswissenschaft 1, und Ltd. Bibliotheksdirektor Hermann Havekost, Bibliotheks- und Informationssystem der Universität.

Die Veröffentlichungen stellen keine Meinungsäußerung der Universität Oldenburg dar. Für die inhaltlichen Aussagen tragen die jeweiligen Autoren die Verantwortung.

Anschriften der Herausgeber:

Prof. Dr. Friedrich W. Busch
Inst. für Erziehungswiss. 1
Postfach 25 03
2900 Oldenburg
Tel.: 0441/798-4909

Ltd. Bibl. Dir. Hermann Havekost
BIS, Universität Oldenburg
Uhlhornsweg 49-55
2900 Oldenburg
Tel.: 798-4000

Redaktionsanschrift:

Oldenburger Universitätsreden
Bibliotheks- und Informationssystem
der Universität Oldenburg
z.H. Herrn Cord Labeß
Tel.: 0441/798-2261

Oldenburger Universitätsreden

Nr. 43

Peter P. Jaros
Axel Willig

Milzpeptide

Regulatoren des Wachstums
und des Zellstoffwechsels

bis

Bibliotheks- und Informationssystem der Universität Oldenburg

1991

INHALT

Vorwort	5
1. Die Milz als Quelle von Regulatorproteinen; Wachstumsfaktoren und Cytokinen	7
2. Isolierung eines proliferationsstimulierenden Faktors aus der Milz	25
3. Einfluß einer Milzfraktion auf den Energie- stoffwechsel von Tumorzellen	41
4. Polyamine als Wachstumsmodulatoren - in vitro Untersuchungen	67
5. Die Beteiligung von Calmodulin an der Prolif- eration normaler und Tumorzellen unter besonderer Berücksichtigung von Milzfaktoren	95
Die Autoren	129

VORWORT

Die Milz: Syntheseort für Wachstumsfaktoren

Man macht es sich zu einfach, wenn man Theophrast von Hohenheim (Paracelsus, 1494 bis 1541) folgt, der behauptete, die Milz erzeuge nur Härte, Fieber und Fäulnis, es lebe sich deshalb besser ohne, als mit derselben (aus Tischendorf, 1970). Schon der Volksmund wußte es besser: mit der Entfernung der Milz vergehe einem auch das Lachen (wohl wegen der unmittelbaren Nähe des Zwerchfells). Überhaupt ist die Milz immer mit psychischen Aspekten in Verbindung gebracht worden. So galt der Spleen (engl. = Milz), im Sinne von Grille oder extravaganter Laune etwa um 1770 in den deutschen Sprachgebrauch eingeführt, als Folge einer Stauung in der Milz. Vom Spleen würden vor allem gescheite, gelehrte Leute und insbesondere geistreiche Frauen ergriffen. Spleen ist der Stiefbruder des Humors und der erste Schritt zur Hypochondrie ("unter den Rippen") und zur Melancholie. Während der Spleen aus dem psychologischen Sprachgebrauch verschwunden ist, sind die Begriffe Hypochonder und Melancholiker noch heute im Gebrauch.

Noch vor wenigen Jahren galt die Milz als "Blutspeicher" oder auch als "Blutfilter" und illustrierte damit einen Kenntnisstand, der nur unwesentlich von dem eines Galen oder Paracelsus unterschieden war. Von vereinzelt abgesehen konzentrierten sich die wissenschaftlichen Untersuchungen auf Organe, wie die Thymusdrüse, um unsere Kenntnis hinsichtlich grundlegender Vorgänge wie Immunabwehr, Regeneration, Altern und Zelldifferenzierung aus dem Bereich der Mutmaßung in ein anfängliches Verstehen zu entwickeln. Obschon als integraler Bestandteil des reti-

culoendothelialen Systems bekannt, gewann die Milz in der letzten Dekade als Ausgangsmaterial für die Isolierung zahlreicher Faktoren an Bedeutung, deren Wirkungsspektrum sich auf eben diese o.g. Prozesse beziehen. Im Vordergrund der hier vorgestellten Untersuchungen stehen Faktoren, die das Wachstum bestimmter Zelltypen stimulieren. Daneben wird der Einfluß von aufgearbeiteten Milzextrakten auf den zellulären Stoffwechsel beschrieben, wobei Kalzium-bindende Proteine auf Grund ihrer Bedeutung für die Zellteilung eingehender untersucht werden. Da sich der Experimentator auf der Suche nach Wachstumsfaktoren überwiegend Zelllinien bedient, die in geeigneten Kulturmedien wachsen, kommt der relativ hohen Konzentration der Milz an Polyaminen ein besonderes Gewicht zu. Das im Kulturmedium enthaltene Serum enthält Enzyme, die Polyamine unter den Kulturbedingungen zu toxischen Substanzen umbauen. Es resultiert ein Artefakt, das gelegentlich fälschlicherweise als Hemmung des bösartigen Gewuchswachstums interpretiert wird.

Die hohe Konzentration an unterschiedlichen Lymphocyten-Populationen und Thrombocyten in der Milz gewährleistet jedoch einen guten Zugriff auf deren Sekretionsprodukte, die sowohl als Wachstumsmodulatoren, als auch als Reifungs- und Differenzierungsfaktoren für immunkompetente Zellen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Oldenburg, im Februar 1991

Hermann Havekost

PETER P. JAROS UND WALTER DITTRICH

Die Milz als Quelle von Regulatorproteinen, Wachstumsfaktoren und Cytokinen.

Bereits zur Jahrhundertwende war bekannt, daß in der Milz außerordentlich selten primäre Tumoren auftraten, was zahlreiche Untersucher veranlaßte, in Milzextrakten nach einem Wachstumsinhibitor zu suchen, der gegen neoplastische Erkrankungen eingesetzt werden könnte. Die Auswertung zahlreicher Experimente mit Milzextrakten an Mäusen ließ Woglom (1919) in vielbeachteten Artikeln zu der Überzeugung gelangen, daß in der Milz ein Faktor produziert werde, der Tumorstadium hemme. Dieses von ihm selbst etwa 30 Jahre später als "unsterblich, aber falsch" bezeichnete Konzept (Woglom, 1947) löste eine intensive Suche nach antimetastatischen Substanzen in der Milz aus. In umfangreichen Versuchen demonstrierten Ludwig und von Ries (1935), daß im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen mit Milzextrakt vorbehandelte Tumorzellen in Mäusen keine soliden Tumoren induzierten. Diese Resultate konnten sie in vitro an humanen Krebszellen bestätigen, deren Wachstum gehemmt wurde.

So konnte Lewisohn (1938) mit subkutanen Injektionen eines konzentrierten alkoholischen Extrakts aus Rindermilz eine 60 %ige Regression von implantierten Sarkomen erreichen. Amersbach et al. (1946) beobachteten in klinischen Versuchen die Regression von 20 Epitheliomas. Lediglich in einem Fall konnte keine Regression festgestellt werden. Ähnlich gute Erfolge konnten z.B. Diller und Watson (1949) mit einem wässrigen Milzextrakt im Tiermodell verzeichnen.

Andere Autoren fanden nur geringe oder keine Effekte mit Extrakten aus der Milz. Die umfangreiche und kontroverse Literatur zu diesem Aspekt ist in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefaßt (Braunstein 1933, Amersbach et al. 1946, Diller 1955) und soll hier nicht weiter diskutiert werden, weil die verwendeten Milzextrakte in der Folgezeit nicht weiter aufgereinigt wurden und es in keinem Fall gelungen ist, eine Reindarstellung der aktiven Moleküle durchzuführen.

Die Suche nach antimitotischen Substanzen wurde zum Ende der 50er Jahre begleitet von der allgemeineren Frage, wie der Zellzyklus kontrolliert wird. Von Bullough (1975) wurde ein im wesentlichen theoretisches Konzept eingeführt, nach dem die konstante Masse eines Organs oder Gewebes das Resultat eines Gleichgewichtes zwischen Wachstumsfaktoren und Wachstumsinhibitoren sein sollte. Die als Chalone bezeichneten Wachstumsinhibitoren sollten gewebespezifisch, nicht artspezifisch, reversibel und nicht cytotoxisch sein.

Eine intensive Suche nach den vorhergesagten Chalonen - bis heute sind über 500 Publikationen zu diesem Thema erschienen (Langen, 1985) - führte zwar zu vielen erfolgversprechenden Resultaten, insbesondere auch bei Chalonen aus der Milz, aber die Reindarstellung auch nur eines einzigen Chalons ist bis zum Beginn der 80er Jahre nicht gelungen. Einzelheiten hierzu sind den Übersichtsartikeln von Potter (1983), Langen (1985), Bullough (1975) und Lozzio et al. (1975) zu entnehmen.

Insbesondere wegen der fehlenden Reindarstellung, aber auch wegen einer Reihe von methodischen Fehlern und Problemen (Patt und Houck, 1980) wurde dieses Konzept im wesentlichen aufgegeben, während etwa gleichzeitig die Interferone als Regulatoren der Zellproliferation mit eindeutig

antiproliferativen und antiviralen Eigenschaften entdeckt wurden (Clemens und McNurlan 1985).

Bedingt durch weitere Fortschritte in der Immunologie, Biochemie und Zellkultur wurde die repräsentative Stellung der Milz im reticuloendothelialen System zunehmend deutlicher. Auch änderten sich die Fragestellungen; man versuchte nicht mehr, aus diesem "mystischen Organ" (Paracelsus) den Wirkstoff zu isolieren, sondern man analysierte die Gesamtheit aller biochemisch charakterisierbaren Substanzen, ihr Wirkungsspektrum und ihre Integration in das Netzwerk der regenerativen und immunmodulatorischen Prozesse.

Bekannt ist die Milz hinlänglich für ihr Sequestrationsvermögen für Thrombocyten (bis zu 30%) und in geringerem Umfang auch für Erythrocyten (Wadenvik und Kutti 1988). Ihre herausragende Rolle für die Plasmavolumenkontrolle wurde bereits von Lewis (1983) diskutiert. Die Annahme, daß die Milz einen wesentlichen Beitrag zur Bildung und Speicherung von Erythropoietin leistet, konnte nicht in dem erwarteten Umfang bestätigt werden, hingegen wiesen Collovan et al. (1987) Transferrin und Ferritin in hohen Konzentrationen in der Milz nach, letzteres mit Werten bis zu 1 mg/g Frischgewicht. Da Ferritin, ein aus 24 Untereinheiten bestehendes 480 kDa Protein, pro Molekül 45.000 Eisentome bindet, darf die Milz als das wichtigste Eisenspeicherorgan angesehen werden.

In den letzten Jahren gelang die Isolierung zahlreicher Faktoren aus Milzen unterschiedlicher Spezies, denen eine besondere Bedeutung für die Wachstumsregulation unterschiedlicher Zelltypen und Gewebe zukommt. So isolierten Lozzio et al. (1978) einen endogenen cytotoxischen Faktor aus der Milz des Menschen und des Rindes, der die DNA-, RNA- und Proteinsynthese hemmt und ein Molekulargewicht von etwa 2 kDa besitzt. Er ist cytotoxisch für Epidermiszellen, Fibroblasten und die Leukämiezelllinien K-562

und Molt-4. Miyata und Kihara (1982) reinigten durch Chromatographie mit Sephadex G 75 ein 14 kDa Peptid aus Überständen von Milzzellen der Maus, das selektiv die DNA-Synthese inhibiert. Mit 15 µg/ml Zellkulturmedium zeigten die Autoren eine 50 %ige Hemmung der ³H-Thymidin-Inkorporation in Hela, L, HEp2 und Ehrlich-Ascites-Zellen. In diesem Zusammenhang ist die Darstellung einer lysosomalen Desoxyribonuklease II von Wichtigkeit, die die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen in der DNA katalysiert und somit die DNA-Degradation reguliert (Liao et al. 1989). In Abhängigkeit von Spezies und Gewebe liegt das Molekulargewicht des Enzyms zwischen 26 und 45 kDa. Wenngleich dieses Enzym kein milzspezifisches Protein darstellt, zeigt es im Zusammenwirken mit den im folgenden genannten Proteinen, deren Vorkommen sicher auch nicht auf die Milz beschränkt sein dürfte, die außerordentliche stoffwechselphysiologische Aktivität dieses Organs hinsichtlich der Aktivierung und Inaktivierung unterschiedlicher Zellkompartimente. Zum Inventar der Milz gehören ferner verschiedene kollagenabbauende Cystein-Proteasen von 23-34 kDa, die als Cathepsine bezeichnet werden und sich in den Lysosomen nachweisen lassen. Sie wurden von Maciewicz und Etherington (1988) aus der Kaninchenmilz isoliert. Sie regulieren den intrazellulären Proteinturnover und den Abbau der extrazellulären Matrix bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Arthritis, Muskeldystrophien und Tumormetastasen. Weitere Cathepsine wurden von Wiederanders et al. (1989) aus der Rattenmilz isoliert.

Als ein weiteres Charakteristikum ist die Anwesenheit zahlreicher Proteaseinhibitoren in der Milz zu nennen. Fioretti et al. (1983) isolierten 4 Typen (I-IV) mit einem Molekulargewicht zwischen 6,5 und 10,6 kDa, die sich nach isoelektrischer Fokussierung als basische Proteine darstellten. Der Typ IV ist identisch mit dem als Kunitz-Typ bezeichneten Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas, während die Typen

I-III funktionelle und strukturelle Homologien zum Kunitz-Typ zeigen. Die antiproteolytische Aktivität ist gegen Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein (Fioretti et al. 1983) und Elastase aus Leukocyten (Fioretti et al. 1989) gerichtet. Immunocytochemische Studien (Businario et al. 1987) zeigten, daß die Inhibitoren vom Typ I-III mit den glatten Muskelzellen von Gefäßen in der Milz assoziiert sind, während der Typ IV ausschließlich in Mastzellen zu finden ist.

Inhibitoren mit einem gänzlich verschiedenen Wirkungsspektrum isolierten Munakata et al. (1987) aus der Schweinemilz. Es sind Dermatansulfate, die im Vergleich mit Isolaten aus anderen Geweben die höchste mit dem Heparin Cofaktor II assoziierte Thrombininhibitorwirkung besitzen.

Das als "Grünes Milz-Hämprotein" bekannte Enzym wurde kürzlich von Ikeda-Saito et al. (1989) als Granulozyten-Myeloperoxidase identifiziert. Es handelt sich um die Hauptkomponente des antimikrobiellen Systems der polymorphkernigen Neutrophilen. Es enthält ein Fe-Tetramer und besitzt ein Molekulargewicht von 150 kDa. Ebenfalls aus der Rindermilz isolierten Kong und Wang (1987) eine Tyrosin-Proteinkinase (PTK). Tyrosinkinase sind Bestandteile bzw. assoziiert mit den membranständigen Rezeptoren für den Epidermal growth factor (EGF), Platelet derived growth factor (PDGF), Insulin und Somatomedin C. Zusätzlich wurde eine cytoplasmatische PTK nachgewiesen, deren physiologische Rolle allerdings noch weitgehend unbekannt ist. Die Tyrosinkinaseaktivität ist in der Milz höher als in anderen Geweben.

Der Tumor Necrosis Factor (TNF) läßt sich in der stimulierten Milz in recht hohen Konzentrationen nachweisen. Diese bereits gut untersuchte Substanz (Übersicht bei Fiers et al. 1987) induziert vermutlich über internalisierte Rezeptoren eine Phospholipase und gleichzeitig die Produktion verschiedener cytotoxischer Substanzen. Normalzellen können sich

durch Produktion von detoxifizierenden Substanzen selbst schützen, während z.B. Tumorzellen dazu nicht in der Lage sind.

Die Bedeutung der Milz wird noch stärker hervorgehoben, durch den in den letzten Jahren forciert vorangetriebenen Nachweis von Faktoren, die mittelbar oder unmittelbar Einfluß nehmen auf die Vorgänge der Regeneration, des Wachstums und der immunologischen Wechselwirkungen im Organismus. Wenngleich für die Differenzierung und Reifung von T-Lymphocyten der Thymus eine zentrale Stellung einnimmt und verschiedene Faktoren der Milz dem Thymus gleichermaßen zukommen, zeigen sich doch auch erhebliche Unterschiede. Borek (1986) wies darauf hin, daß bei splenectomierten Tieren CD4-Zellen undifferenziert bleiben und die Interaktion zwischen T- und B-Lymphocyten eingeschränkt ist.

Kinohara und Makinodan (1987) zeigten, daß ein 68 KDa Thymusfaktor Interleukin-2 stimulierbare T-Zellen im Thymus, nicht aber in der Milz in der Differenzierung hemmen. Hinzu kommt, da Thymopoietin bzw. ein Pentapeptid aus den Aminosäuren 32-36, das als Thymopentin bezeichnet wird, in vitro die B-Zelldifferenzierung hemmt und T-Zell-Precursor induziert, während das nur in einer Aminosäure unterschiedliche Splenin (Splenopentin) sowohl B- als auch T-Zell-Precursor zu induzieren vermag (Audhya et al. 1987). Auch zeigt sich, daß Ts-Precursor und Ts-Inducer-Zellen vorwiegend in der Milz vorkommen, wie durch das Auftreten von CD4+ 2H4+ und CD8+ CD11+ Zellen von Emara et al. (1987 a,b) nachgewiesen wurde. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht die unabhängig voneinander erzielte Isolierung eines CD8-Reifungsfaktors aus der Mäusemilz von zwei Arbeitsgruppen (Campbell et al. 1987, Nishi et al. 1987). Ausgangspunkt war die Feststellung, daß sialinsäurearme Thymozyten-Vorläufer-Zellen in Anwesenheit von Concanavalin A (Con A) nicht proliferieren, kein Interleukin

2 (IL 2) produzieren, keine B/T-Zell-Interaktion initiieren und sich nach Stimulation mit IL2/Con A nicht in cytotoxische T-Zellen differenzieren. Der von den o.g. Laboratorien gereinigte 33-48 kDa CD8-Reifungsfaktor der Milz führt zu einer Differenzierung dieses Zelltyps zu cytotoxischen T-Zellen in Gegenwart von Con A mit IL2.

Die Bedeutung von Milzfaktoren für die Generierung immunkompetenter Zellen wird durch zahlreiche kürzlich isolierte Peptide unter Beweis gestellt. Akiyoshi et al. (1987) konnten zeigen, daß die Lymphokin-aktivierte "natural killer-cell"-Aktivität (NK) in menschlichen Milz-NK-Populationen wesentlich höher ist als in allen anderen retikuloendothelialen Geweben. Bislang nur in der Milz nachgewiesen wurde ein 35-45 kDa Faktor, der spontan von Milz-T-Lymphocyten produziert wird und die Antikörperproduktion stimuliert. Dieser Faktor wurde bei MRL-Mäusen isoliert und ist nicht identisch mit IL 1, 2, 3 oder 5 (Ashiba et al., 1987). Davon unterschieden ist ein wasserlöslicher Faktor, den Oka und Ito (1987) nach Trypanosoma-Infektionen aus der Mäusemilz reinigten und der eine polyclonale B-Zellaktivierung auslöste. Vergleichende Untersuchungen zeigten ferner, daß dieses stimulierende Lymphokin mit keinem bekannten Interleukin identisch ist.

In einem engen Zusammenhang mit der B-Zellaktivierung und der Antikörperproduktion steht ein von Leonardo et al. (1988) am Massachusetts Institute of Technology isoliertes Protein, das für die Expression des Kappa-B-Ketten Gens der Immunglobuline von Bedeutung ist. Das gereinigte NF-KappaB Protein wirkt auf die regulatorischen Nukleotidsequenzen während der B- und T-Zellaktivierung, jedoch auch auf die "Enhancer"-Sequenzen des "human immunodeficiency virus" und des IL 2-Gens. Einen weiteren IL-2 Regulator, der gleichzeitig die NK-Zellen Aktivität gegen Yac-Zellen unterdrückt, ist der "NK-lysis resistance-inducing factor" (LRIF). Dieses 12,6 kDa Regulatorpeptid charakteri-

sierte Saxena et al. (1988) mittels G 100 Chromatographie aus ConA-aktivierten Rattenmilz-Lymphozyten.

Ein weiteres inhibitorisch wirkendes Peptid isolierte Karhumäki et al. (1988) aus der Milz des Menschen und des Schweines. Der als "Transfer Factor" (TF) bezeichnete dialysierbare Faktor unterdrückt in vivo Reaktionen vom Typ der verzögerten Überempfindlichkeit in Meerschweinchen und verringert die Mortalität bei NMRI-Mäusen nach Listeria-Infektionen um etwa 70 % nach Gabe von 10 mg TF pro Tier.

Ein Bindungsprotein des Cyclosporins A konnte die Arbeitsgruppe von Harding an der Yale University aus der Milz und dem Thymus bei Mensch und Rind darstellen. Das 17 kDa Peptid, als Cyclophilin bezeichnet, bindet Cyclosporin A im Cytosol ohne Rezeptorvermittlung. Die zahlreichen bekannten Wirkungen von Cyclosporin A beruhen u.a. auf einer Hemmung der frühen Vorgänge der CD4 Lymphocyten-Aktivierung; es verhindert die Lymphokin-vermittelte Differenzierung und Proliferation von Effektor-T-Zellen und B-Zellen, hemmt die IL-2 mRNA Transkription und die Produktion oder Freisetzung von IL-3, IL-6 und Gamma-Interferon (Übersicht bei Harding et al., 1986).

Eine anabolisch als auch metabolisch interessante Gruppe von Peptiden konnten Castor et al. (1987) aus menschlichen Milz-Lymphocyten isolieren. Die "Connective Tissue Activating Peptides" (CTAP's) stimulieren Synovialzellen, niedermolekulare Hyaluronsäure zu synthetisieren. Daneben konnte ein Anstieg der Glykolyse, der Prostaglandin E₂-Synthese und der intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat-Akkumulation nachgewiesen werden. CTAP III hat darüber hinaus mitogene Eigenschaften; das Molekül entsteht durch Proteolyse eines basischen Proteins, das in den α -Granula von Blutplättchen gespeichert ist. CTAP III wird anschließend durch einen weiteren proteolytischen Abbau in

β -Thromboglobulin umgesetzt. Eine Reihe von Genprodukten, die durch den PDGF induziert werden, gehören zu der Familie der CTAP (Oquenolo et al. 1989). Neben den CTAP's wurden in den letzten Jahren weitere Wachstumsmodulatoren im weiteren Sinne in der Milz nachgewiesen und isoliert, was das Verständnis dieses Organs in Hinblick auf immunologische und regenerative Funktionen erweitert. So führten die Arbeiten von Imamura et al. (1986) zu der Anreicherung eines Faktors, der die Suppressor-T-Zell-Aktivität hemmt und die Überlebenszeit von Knochenmarkzellen in vitro erhöhte. Petursson und Chervenich (1988) schließlich isolierten einen Megakariozyten-Proliferationsfaktor aus der Mäusemilz, der neben der Wachstumstimulation zudem Progenitor-Zellen induziert. Suzuki et al. (1988) stellten aus der Rattenmilz einen Hepatozyten-Regenerations Promotor dar, der nicht identisch ist mit dem Hepatozyten Growth Factor von Nakamura et al. (1986) oder mit dem Epidermal Growth Factor, der in vitro gleichermaßen das Wachstum von Hepatozyten stimuliert. Ebenfalls aus der Rattenmilz isolierte Ohira et al. (1987) einen antagonistischen Wachstumsfaktor, den Hepatozyten-Regenerations Inhibitor. Dieses 50-60 kDa Protein hemmt die DNA-Synthese von Hepatozyten in vitro, ist hitzestabil und kann daher nicht identisch sein mit dem PDGF, der auf Grund des hohen Sequestrationsvermögens der Milz für Thrombozyten in hohen Konzentrationen vorkommt und auch die DNA-Synthese von Hepatozyten hemmt. Aus den Thrombozyten der Milz ist außerdem der Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) zu isolieren, der als autokriner Wachstumsfaktor das Wachstum neoplastischer und normaler Zellen beeinflussen kann, T-Zellwachstum inhibiert und eine antiproliferative Wirkung auf Thymocyten, prä B-Zellen, myeloische Vorläufer und reife B-/T-Zellen haben kann (Übersicht bei Sporn et al., 1987). Als weiterer wichtiger Faktor der Thrombozyten ist der immunmodulierende Platelet Activating Faktor (PAF)

aus der Milz zu isolieren, der die Freisetzung von IL-1 hemmt, die von IL-2 stimuliert (Pignol et al., 1989).

Dittrich et al. (1990) wiesen einen nicht dialysierbaren Faktor nach, der in vitro normale Fibroblasten zum Wachstum anregt, nicht jedoch transformierte oder Krebszelllinien. Das saure Polypeptid hat ein Molekulargewicht von 10-13 kDa und ist nicht mit EGF und wahrscheinlich nicht mit Interleukinen identisch.

Als ein Markstein im Verständnis der zellulären Interaktionen dürfen die Ergebnisse gewertet werden, aus denen sich in den letzten Jahren eine "integrierte Kommunikation zwischen dem Nerven-, dem endokrinen und dem Immunsystem" (Kordon und Bihoreau, 1989) abzeichnet. Hinweise für eine neuroimmunologische Wechselwirkung liefern u.a. Arbeiten von Fuchs et al. (1988), die in Abhängigkeit von der immunologischen Ausgangslage der Milz unterschiedlich hohe Konzentrationen von Norepinephrin und 5-Hydroxytryptamin im Bereich der perivaskulären Scheide zeigen konnten. Lundberg et al. (1989) wiesen Neuropeptid-Y-Rezeptoren in der Milz und dem Hirn nach. Außerdem wurden Rezeptoren für Neuropeptide der Opioid-Gruppe auf verschiedenen immunkompetenten Zellen nachgewiesen, die zu einer Modulation der NK-Zellaktivität, chemotaktischen Verhaltens von Makrophagen und der Aktivität von cytotoxischen T-Zellen führen (Übersicht bei Carr et al., 1988).

Galen, der Hausarzt Marc Aurels, glaubte, die Milz extrahiere die Melancholie aus Blut und Leber. Auch nach fast 2 Jahrtausenden ist unser Wissen über die Milz noch gering, doch zeichnet sich ein neues Verständnis dieses komplexen Organs ab.

Danksagung: Die Autoren danken dem Bundesminister für Forschung und Technologie für die Förderung der Arbeiten (No 031 7056 A).

Literatur

- Akiyoshi T, Koba F, Arinaga S, Tsuji H (1987) Activated killer cell activity of spleen cells from patients with gastric carcinoma. *J clin Lab Immunol* 23:197-201
- Amersbach J C, Walter E M, Sperti G S (1946) Treatment of basal cell epithelioma by injection of tissue extracts. *Arch Dermatol Syphil* 54:119-132
- Ashiba T, Hishinuma A, Imai Y, Osawa T (1987) A factor potentiating antibody formation spontaneously produced by splenic T cells of MRL/MP-Ipr mice. *Int Archs Allergy appl Immunol* 83:315-320
- Audhya T, Schlesinger D H, Goldstein G (1987) Isolation and complete amino acid sequence of human thymopoietin and splenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3545-3549
- Borek F (1986) Previously unrecognized functions of the spleen: Development and maintenance of immune competence and regulation. *CRC Crit Rev Immunol* 6:287-293
- Braunstein A (1933) Über die immunobiologische Krebsprophylaxe und konstitutionelle Krebsdisposition. *Z Krebsforsch* 39:321-357
- Bullough W S (1975) Mitotic control in adult mammalian tissues. *Biol Rev* 50:99-127
- Businario R, Fioretti E, Fumagalli L, Citro G, De Renzies G, Ascoli F (1987) Vascular localization of bovine pancreatic trypsin-inhibitor-related molecular forms in bovine spleen. *Eur J Biochem* 165:79-82
- Campbell P A, Collins J M, Stedman K E (1987) A spleen-derived maturational factor allows immature thymocytes, prepared as cells bearing low amounts of surface

- sialic acid, to become cytotoxic T cells. *J Immunol* 139:1385-1392
- Carr D J J, Kim C H, DeCosta B, Jacobson E, Rice K C, Blalock J E (1988) Evidence for a d-class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell Immunol* 116:44-51
- Castor C W, Bignall M C, Furlong A M, Cabral A R, Richardson B C (1987) Extracellular matrix: Possible regulation by growth factors. *Adv Microcirc* 13:57-64
- Clemens M J, McNurlan M A (1985) Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. *Biochem J* 226:345-360
- Collowan J F, Gowan L K, Crow H, Schwabe C, Fish W W (1987) Isolation and partial amino acid sequence of three subunit species of porcine spleen ferritin: Evidence of multiple H subunits. *Arch Biochem Biophys* 259: 105-113
- Diller I (1955) The spleen and spleen extracts in malignancy. *Antiseptic* 52:95-102
- Diller I, Watson G F (1949) The effect of aqueous spleen extract on growth of tumor cells in mice. *Growth* 13:27-44
- Dittrich W, Rothe H, Jaros P P, Willig A (1990) Biological properties and partial purification of a growth factor from porcine spleen. *Exp Cell Res*, in press
- Emara M, Battisto J R (1987 a) A syngeneic splenic cell antigen induces a suppressor T cell in lymph nodes that controls cytotoxic T-cells and primary antibody responses. *Cell Immunol* 105:205-219
- Emara M, Battisto J R (1987 b) The suppressor T cell induced by syngeneic splenic cell antigen down regulates hapten-specific cytotoxic T cells by elaborating a factor

- inhibitory for Il 2-dependent cell replication. *Cell Immunol* 105:220-234
- Fiers W, Brouaert P, Everaert B, Suffys P, Tavernier J, Haesebroek B, Van Roy F (1987) Tumor nekrosis factor: A potential antitumor agent? *J Interferon Res* 7:627-634
- Fioretti E, Angletti M, Paseri D, Ascoli F (1989) Interaction between leukocytic elastase and kunitz-type inhibitors from bovine spleen. *J Prot Chem* 8:51-60
- Fioretti, E, Binotti, I, Barra D, Citro G, Ascoli F Antonini E (1983) Heterogeneity of the basic pancreatic Inhibitor (Kunitz) in various bovine organs. *Eur J Biochem* 130:13-18
- Fuchs B A, Campbell K S, Munson A E (1988) Norepinephrine and serotonin content of the murine spleen: its relationship to lymphocyte β -adrenergic receptor density and the humoral immune response in vivo and in vitro. *Cell Immunol.*:339-351
- Harding M W, Handschuhmacher R E, Speicher D W (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J Biol Chem* 261:8547-8555
- Ikeda-Saito M, Lee H C, Adachi K, Eck H, Prince R, Booth K, Caughey W Kimura S (1989) Demonstration that spleen green hemeprotein is identical to granulocyte myeloperoxidase. *J Biol Chem* 264:4559-4563 10
- Imamura M, Miyazaki T, Fujimato H, Fukuhara T, Kasai M, Itaya T, Sakurada K (1986) The activity of suppressor cells in the spleen of murine bone marrow chimeras. *Transplant* 42:548-555
- Karhumäki E, Marnela K, Krohn K (1988) Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leucocytes and porcine spleen dialysate. *Int J Biochem* 20:1067-1072

- Kinohara N, Makinodan T (1987) Thymic stromal cells produce inhibitors of proliferation of thymic, but not splenic T cells. *Thymus* 10:179-192
- Kong S E, Wang J H (1987) Purification and characterization of a protein tyrosine kinase from bovine spleen. *J Biol Chem* 262:2597-2603
- Kordon C, Bihoreau C (1989) Integrated communication between the nervous, endocrine and immune systems. *Horm Res* 31:100-104
- Langen P (1985) Chalones and other endogenous inhibitors of cell proliferation. In: Torrence P (ed) *Biological response modifiers*. Academic Press New York, pp 265-291
- Lenardo M J, Kuang A, Gifford A, Baltimore D (1988) NF- κ B protein purification from bovine spleen: Nucleotide stimulation and binding site specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8825-29
- Lewis S M (1983) The spleen - mysteries solved and unresolved. *Clin Hematol* 12:363-373
- Lewisohn R (1938) Effect of subcutaneous injections of concentrated spleen extract on mouse sarcoma 180. *Surg Gynecol Obst* 66:563-576
- Liao T, Liao W, Chang H, Lu K (1989) Desoxyribonuclease II purified from the isolated lysosomes of porcine spleen and from porcine liver homogenates. Comparison with desoxyribonuclease II purified from porcine spleen homogenates. *Biochim Biophys Acta* 1007:15-22
- Lozzio B B, Lozzio C B, Bamberger E G (1978) Cytotoxicity of a factor from normal and abnormal human spleens for allogenic leukemia cells. *Am J Hematol* 4:57-65

- Lozzio B B, Lozzio C B, Bamberger E G, Lair S V (1975) Regulators of cell division: Endogenous mitotic inhibitors of mammalian cells. *Int Rev Cytol* 42:1-47
- Ludwig F, von Ries J (1935) Hormone und Karzinom. *Schweizerische Med Wochenschrift* 1:5-7
- Lundberg J M, Rudehill A, Sollevi A, Hamberger A (1989) Evidence for co-transmitter role of neuropeptide Y in the pig spleen. *Br J Pharmacol* 96:675-687
- Maciewicz R A, Etherington D J (1988) A comparison of four cathepsins (B, L, N, and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem J* 256:433-440
- Miyata S, Kihara H (1982) Selective inhibition of DNA synthesis by a protein released from spleen cells. *J Cell Physiol* 110:315-317
- Munakata H, Hsu C, Kodama C, Aikawas J, Sakurada M, Ototani N, Isemura M, Yosizawa Z, Hayashi N (1987) Isolation of dermatan sulfate with high heparin cofactor II-mediated thrombin-inhibitory activity from porcine spleen. *Biochem Biophys Acta* 925:325-331
- Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A (1986) Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6489-6493
- Nishi Y, Hosokava T, Aoike A, Kamahora T, Sudo H, Kawai K (1987) Augmentation of killer activity of murine spleen cells against allogeneic and syngeneic tumor cells by inoculation of alloantigen in vivo. *Microbiol Immunol* 31:1245-1254
- Ohira M, Omeyama K, Taniura M, Yamashita T, Morisawa S (1987) An experimental study of a splenic inhibitory factor influencing hepatic regeneration. *Surgery Gynecol Obstetrics* 164:438-444

- Oka M, Ito Y (1987) Polyclonal B-cell-activating factors produced by spleen cells of mice stimulated with cell homogenate of trypanosoma gambiense. *Inf Immunol* 55: 3162-3167
- Oquendo P, Alberta J, Wen D, Graycar J, Derynck R, Stiles C D (1989) The platelet-derived growth factor - inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet α -granule proteins. *J Biol Chem* 264:4133-4137
- Patt L M, Houck J C (1980) The incredible shrinking chalone. *Febs Letters* 120:163-170
- Petursson S R, Chervenich P A (1988) Effect of spleen cell conditioned medium on megakaryocytopoiesis in a short-term bone marrow culture system. *J Lab Clin Med* 111:110-117
- Pignol B, H nane S, Mencia-Huerta J M, Braquet P (1989) Effect of long-term treatment with platelet activating factor on cytokine production by rat spleen cells. *Int Arch Allergy App Immunol* 88:161-163
- Potter V R (1983) Cancer as a problem in intercellular communication: Regulation by growth-inhibiting factors (chalones). *Prog Nucl Res* 29:161-173
- Saxena R K, Saxena Q B, Adler W H (1988) Properties and characterization of a rat spleen cell-derived factor that induces resistance to natural killer cell lysis in YAC lymphoma cells. *J Immunol* 141:1782-1787
- Sporn M B, Roberts A B, Wakefield L M, Crombrugge B (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045
- Suzuki T, Koga N, Imamura T, Mitsui Y (1988). A novel growth factor in rat spleen which promotes prolifera

- tion of hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Comm* 153:1123-1128
- Toge T, Kuroi K, Kuninobu H, Yamaguchi Y, Kegoya Y, Baba N, Hattori T (1988) Role of the spleen in immunosuppression of gastric cancer: predominance of suppressor precursor and suppressor inducer T cells in the recirculating spleen cells. *Clin exp Immunol* 74:409-412
- Wadenvik H, Kutti J (1988) The spleen and pooling of blood cells. *Eur J Haematol* 41:1-5
- Wiederanders B, Schaper S, Kirschke H (1989) Isolation and some properties of a cathepsin E type proteinase from rat spleen. *Biomed Biochim Acta* 48:23-32
- Woglom W H (1919) The size of the spleen in immune mice. *J Cancer Res* 4:281-344
- Woglom W H (1947) General Review on Cancer Therapy. Approach to tumor Chemotherapy. A.A.A.S. Washington D.C. pp 1-10.

**WALTER DITTRICH, PETER P. JAROS UND
AXEL WILLIG**

*Isolierung eines proliferationsstimulierenden Faktors
aus der Milz*

1 Einführung

Die Milz ist nicht nur das größte lymphatische Organ mit wesentlichen immunregulatorischen Funktionen, sondern auch Herkunftsort vieler Faktoren, die das Wachstum von verschiedenen Zelltypen beeinflussen. Der augenblickliche Kenntnisstand hierzu ist in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefaßt (Borek 1986, Freundlich 1986 und der Beitrag von Jaros und Dittrich in diesem Band) und soll hier nicht weiter diskutiert werden. Es darf angenommen werden, daß insbesondere die Thrombocyten eine wesentliche Quelle von Wachstumsfaktoren sind. Aus den α -Granula sind der transforming-growth-factor (TGF- β) und der platelet derived growth factor (PDGF) isoliert worden. Beide Substanzen spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Proliferation von Bindegewebszellen, die etwa im Falle von Wundheilungsprozessen sichtbar wird. Daneben wurde der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und eine dem EGF ähnliche Substanz, der TGF- α , in Thrombocyten nachgewiesen (Poggi et al., 1988).

Der TGF- β ist eine der ersten Substanzen, die eindeutig wachstumshemmende Wirkungen für eine Reihe von Zelltypen aufweisen, für andere Zelltypen ist er jedoch ein Wachstumsfaktor. Die Wirkung hängt dabei sowohl von der Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren, als auch von der Art des verwendeten Bioassays ab (Roberts et al., 1985). Mit

dem TGF- β steht somit der Prototyp eines bifunktionalen Wachstumsregulators zur Verfügung. Es ist anzunehmen, daß weitere derartige Substanzen vorhanden sind und auf das Proliferationsverhalten von Körperzellen Einfluß nehmen. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir einen neuen Faktor aus der Milz isolieren, der in einer Reihe von Bioassays wirksam ist. Die biologischen und biochemischen Charakteristika dieses Faktors werden - soweit bekannt - nunmehr vorgestellt.

2 *Material und Methoden*

Zur Herstellung eines Milzrohextraktes wurden Schweinemilzen homogenisiert und einer sauren Proteolyse unterzogen. Grobe Reste wurden anschließend mit einem Papierfilter entfernt. Dieser Rohextrakt (hier als M 1 bezeichnet) kann entweder direkt weiterverarbeitet werden oder steht als lyophilisiertes Material zur Verfügung. Bei einer anschließenden Dialyse gegen Wasser mit einer Membran, die Moleküle von 12-14 kD ausschließt, werden etwa 90 % des Trockengewichtes entfernt.

Der in diesem Dialysat enthaltene Wachstumsfaktor wurde an normalen Fibroblasten (3T3, V79, NRK-49F und L929) und an Tumorzelllinien (P388, A549, Yac-1 und HEp2) getestet. Als Nährmedium wurden DMEM bzw. RPMI 1640 + 5 % fötales Kälberserum (FCS) verwendet. Zur Durchführung der Versuche wurden 10^4 Zellen/Well in 24er-Platten ausgesät, der Gehalt an FCS anschließend auf 2 % bzw. 0,1 % gesenkt und die Proben hinzugegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Zellzahl nach 2 Tagen Inkubation in einem mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank bei 37 °C mit einem Coulter Counter bestimmt. Weitere Einzelheiten der Experimente sind bei den jeweiligen Abbildungen angegeben.

3 *Ergebnisse und Diskussion*

Wie aus der Abb. 1 ersichtlich, zeigt das Dialysat eine deutliche wachstumsstimulierende Wirkung auf V79 Zellen, einer Fibroblastenzelllinie aus der Lunge des Chinesischen Hamsters, die als nicht transformiert gilt und bei Mutagenitätstests Anwendung findet. Mit etwa 50 μ g/ml des Dialysats kann hier eine maximale Stimulierung erreicht werden. In der Abb. 2 ist die Zeitabhängigkeit dieses Vorgangs dargestellt. Die unbehandelten Kontrollzellen zeigen infolge der Absenkung des Serumgehalts von 5 % auf 2 % FCS ein verringertes Wachstum. Eine Beschleunigung des Wachstums ist durch Zugabe des Dialysats in diesem Assay bereits nach 24 h feststellbar. Dieser wachstumsstimulierende Effekt ist reversibel, d.h., die Zellen zeigen wieder normale Wachstumsraten an, wenn man den Faktor entfernt. Normale Rattennierenfibroblasten (NRK-49F) proliferieren bei einer solchen Absenkung des Serumgehaltes nicht mehr, aber nach einmaliger Gabe von 50 μ g/ml des dialysierten Milzextraktes wachsen die Zellen nach 2 - 3 Tagen wieder (siehe Abb. 3).

Vergleichbare wachstumstimulierende Wirkungen konnten ebenfalls für 3T3-Fibroblasten und L929-Fibroblasten - beide sind Normalzellen der Maus - gezeigt werden. Dagegen war bei P388-Zellen, einer Myelomalinie aus der Maus, eine stimulierende Wirkung des Milzextraktes nicht nachweisbar. Zur Überprüfung der selektiven Stimulation von Zellen durch den Faktor in M 1 wurden Dosis-Wirkungskurven für 3T3 und P388 erstellt (Abb. 4 A und C). Bei allen hier eingesetzten Konzentrationen wurde bei P388 eine leichte Verringerung der Zellzahl gefunden. P388 hat eine breite Anwendung bei der Suche nach antineoplastischen Substanzen gefunden (Corbett et al., 1987). Auch weitere Zelllinien, wie z.B. die humane Lungenkarzinomlinie A549 werden durch den dialysierten Milzextrakt nicht stimuliert. In der Abb. 5 sind die Resultate der bisher untersuchten

Zelllinien zusammengefaßt, die mit 100 µg/ml des Dialysats behandelt wurden. Das Wachstum der bislang untersuchten Tumorzelllinien wird im Gegensatz zu normalen Fibroblasten nicht stimuliert. Ob dieser Befund generalisiert werden kann, läßt sich zur Zeit noch nicht sagen, da alle untersuchten Normalzellen dem Fibroblastentyp zuzurechnen sind; bei den Tumorzellen jedoch sind lymphoide, myeloide und epidermoide Zelltypen einbezogen. Es kann darüber hinaus nicht ausgeschlossen werden, daß eine Stimulation dieser Zellen unter anderen in vitro Bedingungen nicht doch stattfindet.

Die proliferationsstimulierende Wirkung auf Normalzellen konnte weder mit steigenden Serumkonzentrationen, noch mit Transferrin, nicht essentiellen Aminosäuren oder Vitaminen überlagert werden, so daß Artefakte dieser Art auszuschließen sind (Daten nicht gezeigt).

Als weitere wichtige biologische Eigenschaften konnten synergistische Wirkungen des Milzextraktes mit Insulin und EGF nachgewiesen werden. In Abb. 4 B) ist gezeigt, daß sowohl 5 µg/ml Insulin als auch 200 µg/ml des Milzextraktes die Zahl von 3T3-Zellen um etwa 150 % gegenüber der Kontrolle steigern können, beide Faktoren zusammen erreichen aber eine Stimulation auf 250 %. Bei P388-Zellen (Abb. 4 D) konnte eine synergistische Wirkung mit Insulin nicht gefunden werden. NRK-49F-Zellen wurden als Indikator für synergistische Wirkungen mit EGF verwendet (Abb. 6).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der Faktor aus der Milz in der Lage ist, das Wachstum von V79-Fibroblasten in Weichagar zu ermöglichen. Die Abb. 7 gibt die Resultate eines derartigen Experiments wieder. Dieses Bioassay ist zur Definition des TGF-β benutzt worden, wobei NRK-49F-Zellen als Indikator verwendet wurden, die ohne den TGF-β nicht in Weichagar wachsen können. NRK-Zel-

len konnten mit dem Dialysat bislang jedoch keine Kolonien in Weichagar bilden. TGF-β zeigt darüber hinaus antagonistische Wirkungen mit EGF auf das Monolayerwachstum von NRK-Zellen (Roberts et al., 1985), während mit dem Dialysat synergistische Wirkungen gezeigt wurden. Der Dialysat-Faktor ist also nicht mit dem TGF-β identisch.

Eine erste biochemische Charakterisierung des dialysierten Milzextraktes ergab einen Proteingehalt von etwa 60 %, einen hohen Eisengehalt (0,6 %) und einen DNA-Gehalt von mindestens 2,5 %. Darüber hinaus ist der für die biologische Wirkung verantwortliche Faktor im Dialysat außerordentlich stabil. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 100 °C, pH 1,8, Dithiothreitol, Dodecylsulfat und eine Reihe von Enzymen (Trypsin, Pepsin, Pronase E, Proteinase K, Kollagenase, β-Glucuronidase, Lipase, Amyloglucosidase, Ribonuklease A und Benzon-Nuklease) konnte die biologische Wirkung nicht aufgehoben werden. Es ist durchaus denkbar, daß eine derart stabile Substanz bei oraler Gabe die gastrointestinale Passage biologisch aktiv übersteht. Eine Auftrennung mittels der Molekularsiebchromatographie zeigt einen einzelnen Peak bei etwa 8 - 10 kD (Dittrich et al., 1987), jedoch kann aus dem Elutionsverhalten allein nicht auf das wahre Molekulargewicht geschlossen werden.

Synergistische Wirkungen von Wachstumsfaktoren und anderen Substanzen mit dem Insulin sind bekannt und insbesondere bei 3T3 - Zellen gut untersucht. Straus (1986) hat in einem Übersichtsartikel über die wachstumsstimulierenden Wirkungen von Insulin in vitro und in vivo den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), EGF, PDGF, Prostaglandin F₂, Vasopressin, Phorbolster und Analoge des cAMP als synergistische Substanzen genannt. Vom EGF sind synergistische Wirkungen mit Ascorbinsäure, Vitamin B 12, Glucagon, Thrombin und einer EGF-bindenden Arginin-Esterase bekannt (Carpenter u. Cohen, 1979). Keine dieser Substanzen zeigt eine dem dialysierten Milzextrakt vergleichbare Stabili-

tät bzw. Kombination von biochemischen Charakteristika und biologischen Wirkungen, so daß Anlaß zu der Vermutung besteht, daß es sich hier um einen neuartigen Wachstumsregulator handelt.

Erste Schritte zur weiteren Aufreinigung dieses Faktors sind getan. In der Abb. 8 ist eine Trennung mittels Anionenaustauschchromatographie gezeigt. Die biologische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde an V79 Fibroblasten getestet. Als Einheit (U) wird die Steigerung der Zellzahl von V79-Zellen um 10 % nach 2 Tagen definiert. Es ergibt sich dann für das Dialysat eine Konzentration von etwa 700 U/mg Protein und für die biologisch aktiven Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie etwa 5 000 U/mg Protein, also eine Anreicherung um den Faktor 7. An der weiteren Aufreinigung mit dem Ziel der Reindarstellung und nachfolgender Strukturaufklärung wird gearbeitet. Diese Arbeit wurde durch das BMFT Nr.: 0317056 A gefördert.

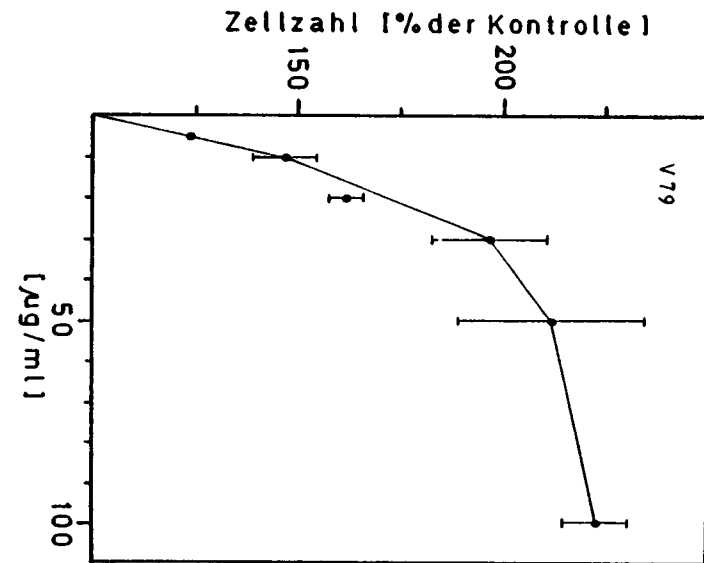


Abb. 1: Wachstum von V79-Zellen mit dem dialysierten Milzextrakt.

Je 10^4 Zellen wurden pro well in 24 well-Platten in DMEM + 5 % FCS ausgesät. 24 h später wurde das Medium gewechselt gegen DMEM + 2 % FCS und gleichzeitig der dialysierte Milzextrakt hinzugegeben. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Plastikoberfläche abgelöst, verdünnt und mit einem Coulter Counter gezählt. Die Graphik gibt die Ergebnisse von 6 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Parallelansätzen pro eingesetzter Konzentration an. Die Zahl der unbehandelten Zellen wurden als 100 % angesetzt. Mit etwa 50 µg/ml des Dialysats kann eine maximale Stimulation auf 200 % erreicht werden.

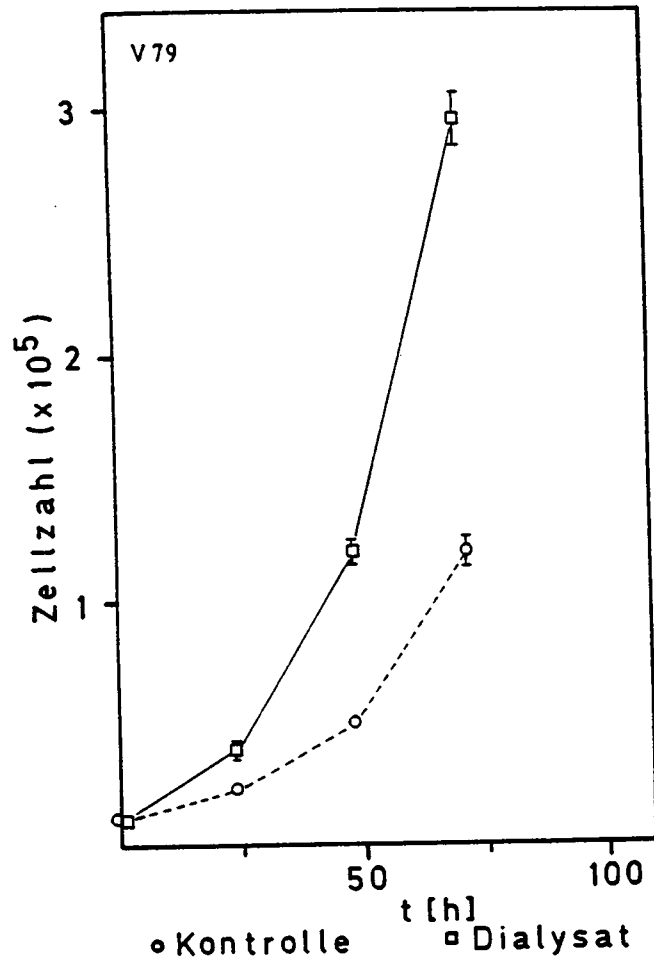


Abb. 2: Zeitabhängigkeit des Wachstums von V79 Zellen.

Die Versuchsdurchführung entspricht den Angaben in Abb. 1. Es wurden 50 µg/ml des Milzextraktes eingesetzt und die Zellzahl in 24 stündigen Intervallen bei je 3 Parallelansätzen bestimmt.

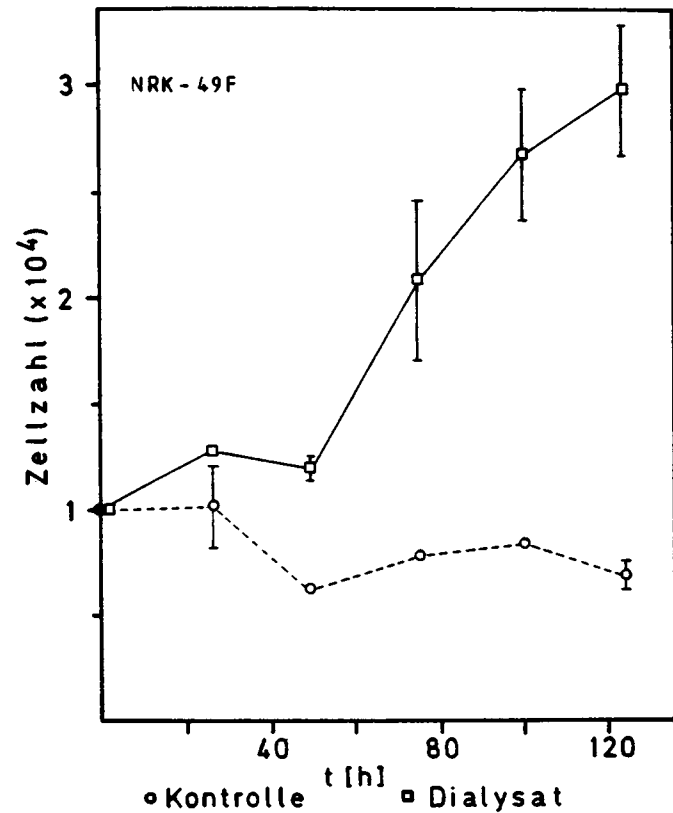


Abb. 3: Zeitabhängigkeit des Wachstums von NRK-49F-Zellen.

Die gleiche Versuchsdurchführung wie in Abb. 2 ergibt bei NRK-Zellen eine Wachstumsinhibition der Kontrollzellen durch die Verringerung des Serumgehaltes. Mit 50 µg/ml des Dialysats zeigt sich nach 2 - 3 Tagen eine deutliche Stimulation des Wachstums.

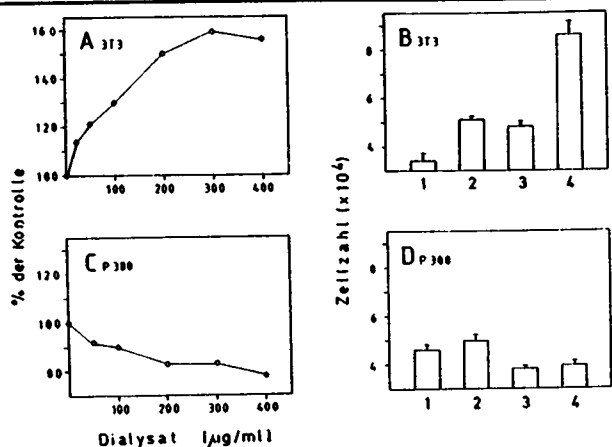


Abb. 4: A) und C) = Dosis-Wirkungs-Kurve für das Wachstum von 3T3-Zellen und P388-Zellen mit dem Dialysat.

A) 3T3-Zellen wurden in DMEM + 5% FCS ausgesät. 24 h später erhielten die Zellen DMEM + 0,1 % FCS + Dialysat. Auch bei so geringen Serumgehalten ist das Dialysat in der Lage, eine dosisabhängige Stimulation des Wachstums zu bewirken. C) P388-Zellen wurden von RPMI 1640 + 5 % FCS in Medium mit 0,1 % FCS übertragen und das Dialysat zugegeben. Da es sich hier um Zellen handelt, die in Suspension wachsen, entfällt die Aussaat und die Behandlung mit Trypsin/EDTA. Die Zellzahl wurde nach 2 Tagen bestimmt. Auch wenn P388 in einem Medium mit 5 % Serum gehalten werden, kann durch das Dialysat keine Wachstumsstimulation hervorrufen (Daten nicht gezeigt). B) und D) = Synergistische Wirkung des Dialysats mit 3T3-Zellen mit Insulin; Vergleich mit P388. Die Zellen wurden von 5 % Serum im Medium auf 0,1 % umgestellt und erhielten 1) keine Zusätze, 2) 5 µg/ml Insulin, 3) 200 µg/ml Dialysat und 4) 5 µg/ml Insulin + 200 µg/ml Dialysat. Bei den 3T3-Zellen sind starke synergistische Effekte zu sehen, dagegen sind solche Effekte bei P388 nicht festzustellen.

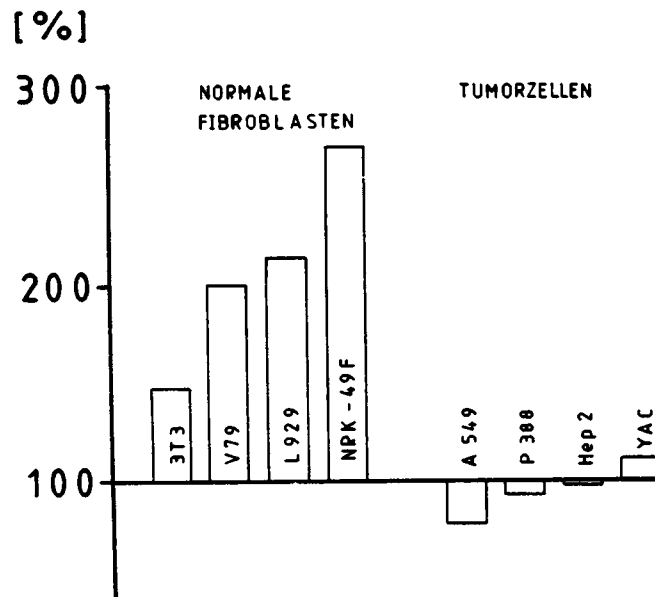


Abb. 5: Spezifität der wachstumsstimulierenden Wirkung des Dialysats.

Alle hier aufgeführten Zelllinien erhielten 100 µg/ml des Dialysats. Das weitere experimentelle Vorgehen entspricht den Angaben in Abb. 1. Bei den Normalzellen handelt es sich um etablierte Fibroblasten von Mäusen. A549 ist eine Lungencarcinom-Zelllinie humanen Ursprungs, Hep2 ist ein epidermoides Karzinom des Menschen, P388 und Yac sind Myeloma- bzw. Lymphomazellen der Maus.

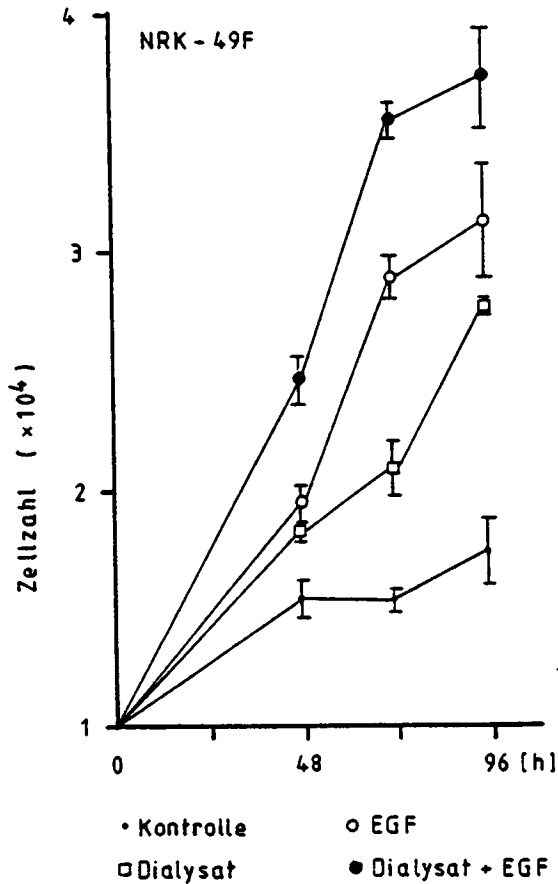


Abb. 6: Synergistische Effekte des Dialysats mit EGF auf das Zellwachstum

NRK-49F-Zellen wurden mit 4 ng/ml EGF oder mit 10 μ g/ml des Dialysats oder mit beiden Zusätzen behandelt. Je drei Parallelansätze wurden nach 2, 3 oder vier Tagen gezählt. Wie beim Insulin sind auch hier deutliche synergistische Effekte sichtbar.

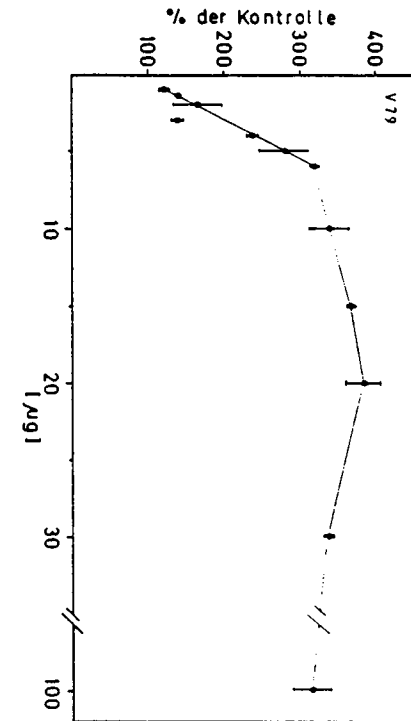


Abb. 7: Wachstum von V79 - Zellen in Weichagar

In Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen wurde ein Basislayer mit 1 ml DMEM + 10 % FCS + 4ng/ml EGF + 0,6 % Agar gegossen. Nach Erstarren des Agars wurde ein Overlay bestehend aus 0,3 % Agar in Medium + Serum + EGF und 1 000 Zellen in 1 ml aufgetragen. Anschließend wurde das Dialysat hinzugegeben. Nach 10 tägiger Inkubation wurden die entstandenen Kolonien angefärbt und manuell ausgezählt. Die Abb. repräsentiert ein typisches Experiment. Die Standardabweichungen zwischen einzelnen Versuchen sind relativ groß, weil in den unbehandelten Kontrollen nur sehr wenige Kolonien wachsen.

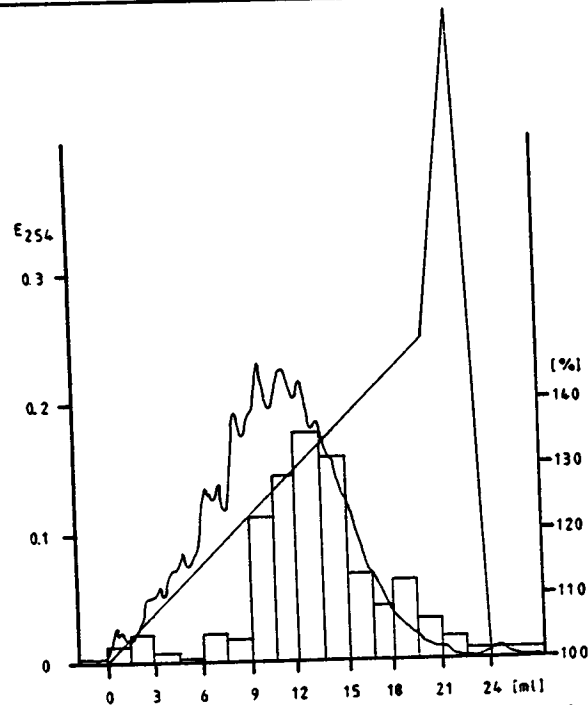


Abb. 8: Trennung des Dialysats mit Anionenaustausch chromatographie

Die Trennung wurde mit einer FPLC-Anlage und einer Mono-Q-Säule durchgeführt. Startpuffer A) = 20 mmol/l Triethanolamin/HCl, pH 7,5; der Gradient wurde mit B) = Startpuffer + 1 mol/l NaCl gefahren. Detektion erfolgte mit einem Durchflußphotometer bei 254 nm. Flußrate: 2 ml/min. Probe: 5 mg des Dialysats in 0,5 ml Wasser. Fraktionen von 1,5 ml wurden gesammelt, mit dest. Wasser dialysiert und je 10 ml im Bioassay an V79-Zellen getestet. Zwischen 25 und 40 % B eluieren Fraktionen mit biologischer Aktivität. Die Fraktionen 9 - 14 wurden zusammengefaßt. Bezogen auf den Proteingehalt ergibt sich eine Anreicherung um den Faktor 7.

Literatur

- Borek F (1986) Previously unrecognized functions of the spleen: Development and maintenance of immune competence and regulation. *CRC Crit Rev Immunol* 6: 287-293
- Carpenter G, Cohen S (1979) Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48:193-216
- Corbett TH, Valeriote FA, Baker LH (1987) Is the P388 murine tumor no longer adequate as a drug discovery model? *Invest New Drugs* 5:3-20
- Dittrich W, Li F, Willig A, Hartleb M, Groscurt R, Jaros PP (1987) The influence of peptide fractions from the spleen on glycolytic enzymes of SV40-3T3 cells. *J Steroid Biochem Suppl* 28: 49s
- Freundlich B, Bomalaski JS, Neilson E, Jimenez SA (1986) Regulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by cytokines. *Immunol Today* 7:30 3-307
- Poggi A, Vicenzi E, Cioce V, Wasteson A (1988) Platelet contribution to cancer cell growth and migration: The role of platelet growth factors. *Haemostasis* 18:18-28
- Roberts A, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB (1985) Type transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:119-123
- Straus DS (1984) Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocrine Rev* 5:356-369

**FANG LI, WALTER DITTRICH, AXEL WILLIG,
PETER P. JAROS**

*Einfluß einer Milzfraktion auf den Energiestoffwechsel von
Tumorzellen*

Im allgemeinen gilt eine erhöhte aerobe Glykolyse-Aktivität als eine der markanten Eigenschaften rasch proliferierender Tumorzellen. Obwohl diese Besonderheit des Energiestoffwechsels der Tumorzelle bereits vor 60 Jahren entdeckt und durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt wurde, ist die Ursache der aeroben Glykolyse und ihre Bedeutung für Wachstum und Proliferation der Tumorzelle ungeklärt und somit Gegenstand wissenschaftlicher Studien und Diskussionen.

Warburg (1926) vertrat die Ansicht, daß die aerobe Lactat-Produktion der Tumorzelle durch einen Defekt in der Atmungskette verursacht wird. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Da der gesamte Gehalt an ATP, ADP, AMP und Pi in der Zelle letztlich konstant bleiben muß, vermutete Racker, daß die Verfügbarkeit von ADP im Cytoplasma der limitierende Faktor für den schnellen Ablauf der aeroben Glykolyse ist. Für die Bereitstellung des ADP maß er der membranständigen Na/K-ATPase eine besondere Bedeutung zu, die das in der Glykolyse gebildete ATP abbaut (Racker 1976). Dabei soll der Kontrollmechanismus gestört sein, der für eine enge Kopplung zwischen Glykolyse (ATP-Produktion) und ATPase-Aktivität (ATP-Verbrauch) verantwortlich ist. Bei genügender Sauerstoff-Zufuhr ist die Produktion von Pyruvat in normalen Zellen auf den Bedarf von Acetyl-CoA und den Energiebedarf eingestellt. Bei der Regulation spielt die Phosphofruktokinase

eine entscheidende Rolle. Sie wird durch überschüssiges ATP aus der oxidativen Phosphorylation inhibiert (Pasteur-Effekt). Dieser Effekt kann nicht durch Fructose-1,6-diphosphat (F-1,6-P₂) aufgehoben werden, weil die Pyruvat-Kinase und die Fructose-1,6-diphosphatase-Aktivität für eine niedrige Konzentration dieses Substrates sorgen. So wird die Umwandlungsrate von F-6-P₂ zu F-1,6-P₂ gebremst. Dies verursacht die Akkumulation von Glukose-6-phosphat (G-6-P), die wiederum die Hexokinase hemmt. Unter anaeroben Bedingungen ist die oxidative ATP-Produktion blockiert. Der ATP-Spiegel sinkt und die Phosphofruktokinase wird reaktiviert. Eine erhöhte AMP Konzentration hemmt gleichzeitig die Fructose-1,6-diphosphatase. Dies führt zu einer Zunahme von F-1,6-P₂, das die Aktivität der Phosphofruktokinase fördert. Das Sinken des G-6-P-Spiegels erhöht nun auch die Hexokinase-Aktivität. All diese Reaktionen ermöglichen den Zellen, die totale glykolytische Kapazität für die ATP-Produktion während der Abwesenheit von O₂ zu nutzen. Pyruvat wird in diesem Fall zu Lactat reduziert und ausgeschieden, um NADH zu regenerieren.

In malignen Zellen wird die hohe Glykolyserate durch die aktivierte Hexokinase (die Mitochondrien-gebundene Form), Phosphofruktokinase und Pyruvat-Kinase gewährleistet. Auffallend ist der hohe Anteil des Pyruvat-Kinase-Isoenzym M₂-Typ. Durch eine deutliche Abnahme der Fructose-1,6-diphosphatase in den malignen Zellen wird die F-1,6-P₂ Konzentration ebenfalls erhöht. Dies führt zur Aufhebung des Pasteur-Effekts und zur Aktivierung der Pyruvat-Kinase vom M₂-Typ. So können die Tumorzellen im Gegensatz zu den normalen Zellen auch unter aeroben Bedingungen die volle glykolytische Kapazität ausnutzen. Aber die erhöhte Lactat-Produktion unter aeroben Bedingungen wurde nur bei Anwesenheit von Glucose im Medium beobachtet, nicht jedoch mit Fructose als Substrat (Reitzer et al., 1979).

Die Rolle der glykolytischen Schlüsselenzyme in der erhöhten aeroben Glykolyse von Tumorzellen wird im folgenden diskutiert.

1 Die Hexokinase

Das Hexose phosphorylierende Enzym (E.C. 2.7.1.1) wurde zuerst von Slein et al. (1950) beschrieben. Es kommt in mehreren molekularen Formen in Mammaliergeweben vor und katalysiert die Reaktion



Die Hexokinase (HK) kann nicht nur Glucose, sondern auch viele andere Hexosen und Hexose-Derivate, wie z.B. Fructose, Mannose, Glucosamin usw., verwerten. Sie wird in der Regel durch ihr Produkt Glucose-6-phosphat inhibiert.

Aus Mammaliergeweben sind vier Hexokinaseisoenzyme isoliert worden. Sie werden entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität mit I bis IV bezeichnet (Ureta, 1982; Katzen und Schimke, 1965). Die Isoenzyme I, II und III, deren Molekulargewicht jeweils ca. 100 kDa beträgt, haben einen niedrigen Km-Wert für Glucose (0.02-0.13 mM), so daß sie als "low Km-Hexokinasen" zusammengefaßt werden. Innerhalb dieser Gruppe ist der Typ III eine Besonderheit: er wird durch Glucosekonzentration über 0.2 mM inhibiert (Ureta, 1982). Der Leber-spezifische Typ IV (ca. 50 kDa) mit einer niedrigen Glucose-Affinität wird auch als Glucokinase bezeichnet (Km = 4.5 mM; Ureta, 1982). Er kann von Insulin induziert werden.

In Hepatom-Zellen der Ratte ist die Glucokinase weitgehend durch Hexokinase III ersetzt. Das Verteilungsmuster entspricht dann demjenigen der fötalen Rattenleber, jedoch mit einer höheren Enzymaktivität pro Gramm Leber (Weinhouse et al., 1972). In den Extrakten aus verschiedenen menschlichen Primärtumoren repräsentiert der Typ I die

Hauptfraktion. Typ II fand sich zusätzlich in allen malignen, nicht jedoch in benignen Tumoren (Kamel und Schwarzfischer, 1975). Gleiche Resultate wurden bei der Untersuchung von Astrocytom-Zellen steigender Malignität gefunden (Bennett et al., 1978).

Zumindest bei dem Ersatz der Glucokinase in Hepatom-Zellen durch den Typ III ist die physiologische Bedeutung klar. Die Glucokinase ist ein Isoenzym mit hohem K_m -Wert für Glucose (10 mM), das von $ADP-Mg^{++}$ und nicht von Glucose-6-phosphat inhibiert wird. Wenn es durch ein Isoenzym ersetzt wird, das zur Klasse der "low K_m "-Isoenzyme gehört, resultiert ein höherer Glucosedurchsatz, da das Enzym unter den physiologischen Bedingungen mit maximaler Aktivität arbeiten kann.

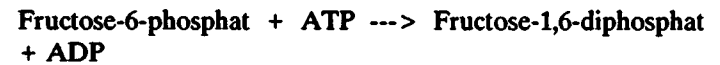
Eine erhöhte Hexokinase-Aktivität wurde bei schnell wachsenden Tumoren und schnell proliferierenden Zellkulturen gefunden. Das Tumor-Enzym gehört zum fötalen Typ und liegt sogar bis zu 60 % an die Mitochondrien gebunden vor (Bustamante und Pedersen, 1977). Die erhöhte Hexokinase Aktivität kann nicht nur eine vermehrte Bereitstellung von Glukose-6-phosphat für die Glykolyse gewährleisten, ihre teilweise Bindung an die Mitochondrien kann auch dazu beitragen, bei der Konkurrenz von Glykolyse und Atmung um ADP und Pi die Glykolyse zu begünstigen, denn die Mitochondrien-gebundene Hexokinase kann das in der Atmungskette gebildete ATP direkt zur Phosphorylierung der Glukose verwenden. Von Bedeutung könnte weiterhin auch sein, daß die mitochondriale Hexokinase nicht mehr von Glukose-6-phosphat inhibiert wird.

Die äußere Mitochondrienmembran ist in Bezug auf ihren Proteinanteil vergleichsweise einfach organisiert. Im wesentlichen finden sich Rezeptorproteine, die Precursormoleküle ins Mitochondrium hineintransportieren und Porenproteine (Porinmoleküle), die für die freie Diffusion von Metaboliten

sorgen, indem sie Porenstrukturen mit einem inneren Durchmesser von etwa 2 nm ausbilden. Hexokinasmoleküle binden sich spezifisch an die Porinmoleküle (Nelson und Kabir 1986).

2 Die Phosphofructokinase

Die Phosphofructokinase (PFK) (E.C. 2.7.1.11) ist eines der Schlüsselenzyme bei der Regulation der Glykolyse und katalysiert die Reaktion



Die PFK hat einen Molekulargewicht von 320-360 kDa und besteht aus vier Untereinheiten, die homogen oder heterogen sein können. Die PFK des Menschen steht unter der Kontrolle von 3 Strukturgenen, die für die sogenannten M-, L- und P-Typ Untereinheiten kodieren. Die Untereinheiten werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert und in zufälliger Weise tetramerisiert (Vora et al., 1985).

Der M-Typ ist die einzige in adultem Muskelgewebe gefundene Form, kommt aber auch im Herzen, Testes, Gehirn und Erythrozyten vor (Kahn et al., 1979). Das Homotetramer wird als M_4 bezeichnet. Der L-Typ steht für Leber PFK, diese wurde auch in reifen polymorphkernigen Zellen und Thrombozyten nachgewiesen. Der P-Typ ist u.a. charakteristisch für die Placenta, Fibroblasten, Nieren und einige maligne Gewebe.

Bei Mäusen gibt es ebenfalls 3 Gene für die Untereinheiten und damit 3 homotetramere Formen des Enzyms (Reid und Masters, 1986). Die Autoren fanden darüber hinaus deutliche Interaktionen zwischen dem Enzym und zellulären Strukturen in allen wichtigen Gewebetypen und allen Entwicklungsstadien, indem sie zwischen gebundenen und lös-

lichen Aktivitäten unterschieden. Solche Interaktionen sollen eine Platzierung der PFK in der Nähe von Mitochondrien oder an Stellen in der Zelle ermöglichen, wo eine anaerobe Energieproduktion notwendig ist. Es gibt Hinweise auf eine reversible Phosphorylierung der PFK. Die Folge davon ist nicht unbedingt eine Veränderung der Enzymkinetik, sondern eine veränderte Lokalisation des Enzyms.

Eine Phosphorylierung der PFK kann u.a. an dem Membranrezeptor für den Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) erfolgen. Dieser Membranrezeptor zeigt ebenso wie die transformierenden Proteine der src-Oncogen-Familie einiger Retroviren eine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität. Die PFK zeigt eine hohe Affinität für die EGF-Rezeptor-Kinase. Sie und eine Reihe weiterer Glykolyse-Enzyme werden an dem EGF-Rezeptor phosphoryliert, die PFK jedoch nicht von den transformierenden Proteinen der Retroviren (Reiss et al. 1986).

Daß die verschiedenen Isoenzymentypen in unterschiedlicher Weise reguliert werden, wird bereits bei einer Betrachtung der physiologischen Verhältnisse bei den verschiedenen Geweben deutlich: der Glucoseverbrauch im Gehirn wird unabhängig von den mentalen Leistungen in engen Grenzen konstant gehalten, während die Glykolyserate im Skelettmuskel in Abhängigkeit von den Leistungen erheblichen Schwankungen unterliegt. Die Leber verbraucht nur wenig Glucose über die Glykolyse, gewöhnlich wird dort Glucosegenese betrieben.

Für die maximale Aktivität benötigen die jeweiligen Isoenzyme unterschiedliche ATP-Konzentrationen, eine Überschreitung führt zur Inhibition des Enzyms. Der $I_{0.5}$ -Wert, das ist diejenige ATP-Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibition erreicht wird, beträgt bei 0.4 mM Fructose-6-phosphat und pH 7.1 für den M-Typ 0.4 mM und den P-Typ 0.7 mM ATP. Beim L-Typ wird unter diesen Bedingungen

bereits mit 0.1 mM ATP eine vollständige Inhibition erreicht (Tsai et al., 1975).

Eine weitere auffällige Eigenschaft des Enzyms mit Bedeutung für die Laborpraxis ist die Kälteabilität. Der Aktivitätsverlust durch Kühlung ist reversibel und wird durch niedrige pH-Werte und Enzymkonzentration gesteigert.

Kellett und Robertson (1984) haben einen Proteininhibitor der PFK aus der Dünndarmmucosa von hungrigen Ratten isoliert. Die PFK von hungrigen Tieren wird durch ATP stärker inhibiert, als von normal ernährten. Ein ähnlicher Effekt wird auch in der Leber erreicht; hier ist der Effekt auf die allosterischen Eigenschaften von Fructose-2,6-diphosphat zurückzuführen. In der Mucosa kommt jedoch kein Fructose-2,6-diphosphat vor. Die oben genannten Autoren machen für den Effekt in der Mucosa ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa verantwortlich. Es handelt sich hier möglicherweise um einen Regulationsvorgang, der unabhängig von dem Glucoseangebot ist. Die PFK-Aktivitäten in den Geweben sind abhängig von dem jeweiligen Entwicklungsstand. Die fötale Rattenleber enthält 2 Isoenzyme, PFK-M und PFK-L. Beide 2 Aktivitäten sinken innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt ab. PFK-M ist nach einer Woche nicht mehr nachzuweisen. Das Absinken der PFK-Aktivität nach der Geburt korreliert mit der Fähigkeit der neonatalen Leber, Glucose zu produzieren.

Bei Ratten steigt die Gesamtaktivität in verschiedenen Geweben wie etwa Muskel, Herz und Gehirn nach der Geburt kräftig an. Im Muskelgewebe korreliert dies mit dem Wachsen der kontraktile Fähigkeiten.

In exponentiell wachsenden menschlichen Fibroblasten ist die spezifische Aktivität der PFK 7-8 mal höher als in ruhenden Zellen. Das Verhältnis von P-Typ zum L-Typ bleibt in ruhenden und wachsenden Zellen jedoch gleich bei 4:1 (Meienhofer et al., 1983).

Nakamura et al. (1985, 1986) konnten zeigen, daß das Serum von Krebskranken die PFK-Aktivität *in vitro* unterdrücken kann. 70 % der Seren von erkrankten Personen unterdrückten die PFK-Aktivität in signifikanter Weise unabhängig vom Geschlecht, der Größe und Art des Tumors. Der "suppressive Faktor" konnte bislang nicht charakterisiert werden. Es wurden jedoch bereits erste Anreicherungsstufen für den Faktor beschrieben. Dieser molekularbiologisch noch völlig im dunklen liegende Befund ist möglicherweise als neues Verfahren zur Früherkennung von Tumoren geeignet.

3 Die Pyruvat-Kinase

Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40) katalysiert eine der wichtigsten Reaktionen der Glykolyse, die Übertragung der Phosphat-Gruppe vom Phosphoenolpyruvat auf ADP. Die Reaktion verläuft stark exergonisch und unter intrazellulären Bedingungen irreversibel. Das Enzym bedarf Mg^{++} oder Mn^{++} , mit denen es vor der Substratbindung einen Komplex bilden muß. Ca^{++} konkurriert mit Mg^{++} und Mn^{++} um die Bindungsstelle am Enzym und hemmt die Bildung des Komplexes kompetitiv, so daß außer cAMP das Kalzium (durch eine Ca^{++} /Calmodulin abhängige Protein-Kinase) bei der Regulation der Pyruvat-Kinase-Aktivität eine Rolle spielen kann (Ochs, 1988). Unter physiologischen Bedingungen dient K^+ als Aktivator.

Vier Isoenzyme der Pyruvat-Kinase wurden aus den Geweben der Vertebraten isoliert (Imamura et al., 1972; Harada et al., 1970; Hall und Cottam, 1978; Munday et al., 1980). Pyruvat-Kinase L-Typ ist das Hauptisozym in der Leber und kann allosterisch beeinflusst werden. Das Enzym kann von F-1,6- P_2 aktiviert werden. Das ähnliche R-Isoenzym wurde nur aus Erythrozyten isoliert. Beide Isoenzymen werden von demselben Gen kodiert, obwohl sie unterschiedliche Promotoren benutzen (Noguchi et al., 1987). Das M_1 -Isoenzym ist die einzige Form im adulten Skelettmuskel und

kommt auch im Herzmuskel und im Gehirn vor. Das M_2 -Isoenzym ist in verschiedenen Geweben vorhanden, besonders in den fötalen Geweben und den Tumoren.

Die Leber besitzt eine zentrale Funktion für das dynamische Gleichgewicht des Glucose-Stoffwechsels durch die Regulation der Glykolyse und der Gluconeogenese. Dabei spielen Insulin und Glucagon eine wichtige Rolle. Taunton et al. (1974) konnten zeigen, daß eine Injektion von Insulin bzw. Glucagon bei Ratten eine rapide Änderung der Aktivität von glykolytischen Enzymen in der Leber verursacht. Die Pyruvat-Kinase-Aktivität wurde z.B. von Insulin erhöht, und von Glukagon erniedrigt. Während Insulin keine signifikante Änderung der cAMP-Konzentration verursachte, war eine Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Glukagon zu beobachten.

Die Leber enthält zwei Isoenzyme der Pyruvat-Kinase (Tanaka et al., 1965; Eigenbrodt und Schoner, 1977). Das Hauptisozym ist der L-Typ, M_2 -Typ kommt nur in geringen Mengen vor. Van Berkel et al., (1972) konnten zeigen, daß das L-Typ Isoenzym nur in den parenchymalen Zellen der Leber und das M_2 -Typ Isoenzym in den Kupffer'schen Sternzellen vorhanden ist.

L-Typ Isoenzym ist ein allosterisches Enzym. Außer von den genannten Hormonen kann seine Aktivität auch von äußeren Faktoren wie der Nahrung beeinflusst werden (Kohl und Cottam, 1977; Cognet et al., 1987). Pyruvat-Kinase L-Typ zeigt eine positive Kooperativität mit seinem Substrat Phosphoenolpyruvat, d.h., seine Kinetik-Kurve verläuft sigmoid. Es kann von F-1,6- P_2 aktiviert werden, so daß die Kinetik-Kurve von sigmoid zu hyperbolisch umschaltet. Das Isoenzym ist hemmbar durch L-Alanin. Die Inhibition wird jedoch von F-1,6- P_2 aufgehoben. Wie Tabelle 1 zeigt, hat das L-Typ Isoenzym aus verschiedenen Tierarten in Abwesenheit von F-1,6- P_2 einen K_m -Wert von 0.3-0.96 mM und einen Hill-

Koeffizient von 1.6-2.9. Durch Zugabe von F-1,6-P₂ im mikromolaren Bereich wird die Sättigungskurve für PEP hyperbolisch. Der K_m-Wert sinkt auf 0.03-0.15 mM, und der Hill-Koeffizient auf 1.0. Der K_m-Wert des L-Typ Isoenzym für ADP liegt bei 0.1-0.4 mM, und der I_{0,5}-Wert für ATP und L-Alanin jeweils bei 0.1-0.15 mM und 1.0-10.0 mM (Hall und Cottam, 1978; Noguchi, 1988).

Jedes Molekül des L-Typ Isoenzym kann 4 Moleküle von F-1,6-P₂ binden (Hess und Kutzbach, 1971). Durch die Bindung von F-1,6-P₂ an das Isoenzym wird das pH-Optimum und der isoelektrische Punkt erniedrigt. Der isoelektrische Punkt des Isoenzym in Anwesenheit von F-1,6-P₂ liegt bei 5.3 und in Abwesenheit von F-1,6-P₂ bei 5.8-6.3 (Kohl und Cottam, 1977; Eigenbrodt und Schoner, 1977).

Das Molekulargewicht des L-Typ Isoenzym liegt zwischen 193 und 265 kDa, und die Sedimentationskonstante zwischen 9.4 und 10.0. Das Isoenzym hat eine tetramere Struktur mit vier gleichen Untereinheiten. Das Molekulargewicht der Untereinheiten liegt bei 50-62 kDa (Hall und Cottam, 1978; Noguchi, 1988).

Die Aktivität des L-Typ Isoenzym ist durch die eigene Phosphorylierung reguliert. Anscheinend gibt es zwei Proteinkinasen (cAMP- und Ca⁺⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase), die dafür verantwortlich sind (Sonderling et al., 1986; Hsu et al., 1987). Ob die beiden Proteinkinasen die gleichen Stellen phosphorylieren, ist noch unbekannt.

Über die Natur der Pyruvat-Kinase R-Typ herrscht noch Unklarheit. Es wurde berichtet, daß das R-Typ Isoenzym eine ähnliche Eigenschaft wie die Leber-Pyruvatkinase zeigt (Hall und Cottam, 1978). Als Hinweis auf ein unterschiedliches Wirkungsspektrum könnte jedoch die Tatsache gewertet werden, daß der R-Typ lediglich einen Hill-Koeffizient von 1.2-1.6 und einen höheren isoelektrischen Punkt besitzt (Tab. 1).

Im Gegensatz zum L-Typ Isoenzym verläuft die Kinetik-Kurve des M₁-Typ Isoenzym hyperbolisch, d.h., es zeigt eine Michaelis-Menten Kinetik. Es kann nicht von F-1,6-P₂ aktiviert werden. Sein K_m-Wert für PEP und ADP beträgt jeweils 0.04-0.09 mM und 0.3-0.4 mM (Tab. 1). Der I_{0,5}-Wert für ATP liegt bei 3.0-3.7 mM. Das pH-Optimum des M₁-Typ Isoenzym liegt bei 7.1-7.5, der isoelektrische Punkt zwischen 8.5 und 8.9. Das Molekulargewicht der Pyruvat-Kinase M₁-Typ wurde zwischen 212 und 250 kDa bestimmt und seine Sedimentationskonstante liegt bei 9.2-10.4. Das M₁-Typ Isoenzym besteht aus vier Untereinheiten mit gleichem Molekulargewicht (Hall und Cottam, 1978; Noguchi, 1988).

M₂-Typ Isoenzym ist in adulten Geweben weit verbreitet. Es konnte in der Lunge, der Niere und dem Fettgewebe wie auch in fötalen Geweben und vielen Tumoren nachgewiesen werden (Hall und Cottam, 1978; Eigenbrodt und Glossmann, 1980; Verhagen et al., 1985).

Dieses Isoenzym ist im Gegensatz zum M₁-Isoenzym allosterisch, aber seine Kinetik unterscheidet sich von der des L-Typ Isoenzym. Der K_m-Wert für PEP ohne F-1,6-P₂ liegt bei 0.2-0.4 mM, durch F-1,6-P₂ wird er leicht erniedrigt. In Tabelle 1 werden die K_m- bzw. I_{0,5}-Werte für ADP, ATP und L-Alanin zusammengestellt.

Der isoelektrische Punkt von Pyruvat-Kinase M₂-Typ ist je nach Herkunft sehr unterschiedlich. Aber er liegt im allgemeinen zwischen den pI's von M₁-Typ und L-Typ (Tab. 1).

Das Molekulargewicht des M₂-Typs liegt zwischen 190 und 250 kDa, und die Sedimentationskonstante bei 9.3-10.8. Das Isoenzym ist wie die anderen aus vier Untereinheiten mit äquivalenten Molekulargewicht aufgebaut. Eine heterogene Zusammensetzung wurde jedoch ebenso entdeckt (Verhagen et al., 1985).

Die Aktivität des M_2 -Typ Isoenzym wird durch Phosphorylierung von einer cAMP-unabhängigen Proteinkinase inhibiert (Eigenbrodt und Schoner, 1979). Diese cAMP-unabhängige Proteinkinase zeigt eine Ähnlichkeit mit einem Virusgen-Produkt mit der Bezeichnung pp60^{src}. Sie bindet mit hoher Affinität zur Pyruvat-Kinase M_2 -Typ und phosphoryliert vorzugsweise die dimere Form des Isoenzym. Die Phosphorylierung kann durch F-1,6-P₂, 5-Phosphoribose-1-pyrophosphat (PRPP) und Di-(adenosin-5')-pentaphosphat (AP₅A), strukturell mit Di-(adenosin-5')-tetraphosphat (AP₄A) verwandt, gehemmt werden. In schnell wachsenden Zellen kommen F-1,6-P₂, PRPP und AP₄A in erhöhten Konzentrationen vor. In der Gegenwart von Nukleotid-Diphosphat wird das phosphorylierte M_2 -Typ Isoenzym sehr schnell dephosphoryliert (Eigenbrodt und Glossmann, 1980).

4 Milzfaktoren und deren Wirkung auf den Energiestoffwechsel von Tumorzellen

Die Milz gehört zu den reticuloendothelialen Organen der Vertebraten und nimmt eine zentrale Stellung in der Ausschleusung von Zellen humoraler und zellulärer Immunität ein (siehe den Beitrag von P.P. Jaros und W. Dittrich in diesem Band). Audhya et al. (1987) isolierten und charakterisierten aus der Milz des Menschen das Polypeptid Splenin, das sich in nur vier Aminosäureresten von Thymopoietin aus dem Thymus des Menschen unterscheidet. Beide Polypeptide enthalten jeweils 49 Aminosäure und zeigen immunmodulatorische Wirkung. Fetsch und Maurer (1987) isolierten aus der Kälbermilz ein Chalon mit Granulopoese-inhibitorischer Aktivität. Suzuki et al. (1988) berichteten von der Darstellung eines Faktors aus der Rattenmilz, der die Proliferation der Hepatozyten stimuliert.

Gegenwärtig konzentrieren sich die Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen auf den Nachweis von Milzfaktoren, die das Zellwachstum stimulierend oder inhibierend beein-

flussen. Anhand des Energiestoffwechsels von Tumorzellen wurde in unserer Arbeitsgruppe eine erste Charakterisierung der Wirkung einer Fraktion (siehe den Beitrag von Dittrich W. et al. in diesem Band) aus der Schweinemilz vorgenommen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Milzfraktion auf den Energiestoffwechsel von Tumorzellen wurden die Schlüsselenzyme der Glykolyse und die Na/K-ATPase von SV40-3T3- und Yac-Zellen untersucht. Diese beiden Zelllinien wurden jeweils in DMEM und RPMI 1640 Medium mit oder ohne Milzfraktion (200 µg/ml) 2 bzw. 3 Tage lang kultiviert. Die Medien enthielten 10 % fötales Kälberserum.

Abbildung 1 zeigt die Aktivitäten der Phosphofruktokinase und Hexokinase von SV40-3T3-Zellen nach der Behandlung mit der Milzfraktion. Im Vergleich zur Kontrolle wurden die Aktivitäten dieser beiden Enzyme um über 30 % erhöht. Eine ähnliche Änderung der Aktivitäten von Pyruvat-Kinase und Na/K-ATPase nach der Behandlung mit der Milzfraktion konnte auch bei Yac-Zellen festgestellt werden (Abb. 2).

Im Licht dieser Ergebnisse wird deutlich, daß alle hier untersuchten glykolytischen Enzyme sich unter dem Einfluß von der Milzfraktion etwa synchron verhalten haben. Ein solches synchrones Verhalten der glykolytischen Enzyme kann auch in der Leber beobachtet werden: durch Insulin kann eine dosisabhängige Steigerung der Enzymaktivitäten erreicht werden, während die Synthese der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese unterdrückt wird. Durch Versuche mit hungernden Tieren konnten weitere Hinweise auf ein synchrones Verhalten dieser Enzyme gefunden werden. Eine Generalisierung dieses Verhaltens auch für andere Gewebetypen ist postuliert worden (Weber et al., 1966).

Sowohl für Gewebe humanen Ursprungs, als auch für solche von Nagern ist etabliert, daß die PFK-Aktivität bei prolifere-

rierenden Zellen erhöht ist (Vora et al. 1985; Meienhofer et al. 1983). Meienhofer et al. (1983) fanden eine Erhöhung der PFK-Aktivität in exponentiell wachsenden menschlichen Fibroblasten um das 7-8fache im Vergleich zu ruhenden Zellen. Darüber hinaus ist die Aktivität in allen malignen Zellen lymphoiden, myeloiden, erythroiden und fibroblastischen Ursprungs um ein mehrfaches der Aktivität der normalen Vergleichszellen erhöht. Die höchsten Aktivitäten wurden in schnell replizierenden HeLa- und KB-Zellen gefunden (Vora et al., 1985).

Die aus der unbehandelten Kultur (Kontrolle) gewonnene Pyruvat-Kinase wurde stärker durch Fructose-1,6-diphosphat (FDP) aktiviert als die aus der mit Milzfraktion behandelten Kultur (Abb. 3), während die Pyruvat-Kinase der Kontrolle weniger stark durch L-Alanin gehemmt wurde (Abb. 4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Isoenzym-Muster vom L-Typ zum M_2 -Typ verschoben wird (Tab. 1). Eine erhöhte spezifische Aktivität der Pyruvat-Kinase und eine Verschiebung des Isoenzym-Musters zugunsten des M_2 -Typs zugleich deuten im allgemeinen auf eine neoplastische Veränderung der Zellen. Verhagen et al. (1985) fanden eine Erhöhung der Pyruvat-Kinase-Aktivität in den Schilddrüsenkarzinomen des Menschen um das 6-7fache im Vergleich zu den normalen Schilddrüsen.

Na^+/K^+ -ATPasen sind in der Zellmembran lokalisiert. Sie fördern die Na^+ -Ionen aus der Zelle und K^+ -Ionen in die Zelle. Bei der Hydrolyse eines ATP-Moleküls werden 3 Na^+ nach außen und 2 K^+ nach innen gepumpt (Skou, 1988). So wird ein elektrochemischer Gradient der Kationen geschaffen. Es gibt Hinweise, daß die Na/K-ATPase im engen Zusammenhang mit der Glykolyse steht, indem sie das glykolytisch entstandene ATP verbraucht und ADP erneut bereitstellt. Racker konnte zeigen, daß Ouabain, ein spezifischer Inhibitor für Na/K-ATPase, die Glykolyserate bei manchen Tumoren um 50 % reduziert (Racker et al., 1983).

Die Na/K-ATPase-Aktivität wurde durch die Milzfraktion ebenfalls erhöht (Abb. 2). Das bedeutet einen intensiveren Energiestoffwechsel in der Zelle.

Die Veränderung der Aktivitäten der glykolytischen Enzyme entsprechen den Voraussetzungen des von Weber (1977a; b) entwickelten Konzepts der molekularen Korrelation. Dieses Konzept besagt, daß die biochemische Strategie des Genoms einer neoplastischen Zelle durch die Aufklärung des Expressionsmusters von Schlüsselenzymen erkannt werden kann, also ihrer Aktivität, Konzentration und Isoenzymverteilung sowie deren Zusammenhang mit der neoplastischen Transformation und Progression. Das maligne Programm kann nach dem Konzept Webers in verschieden starker Weise exprimiert werden. Diese gestaffelte Expression des neoplastischen Programms in einem Spektrum von Neoplasmen in einem bestimmten Zelltyp wird als Progression bezeichnet. Parallel mit der gestaffelten Malignität von verschiedenen Tumorklinen desselben Zelltyps sollen die Aktivitäten und Konzentrationen verschiedener Enzyme zunehmen, während diejenigen Enzyme, die die umgekehrte Reaktion katalysieren, abnehmen. Alle Tumorklinen haben darüber hinaus ein gemeinsames Programm, das durch die Transformation erzeugt und vererbbar ist. Veränderungen des Enzymmusters, die alle Tumorklinen betreffen, stellen Marker der Transformation dar.

Zur Abschätzung der Veränderung des Protein- und DNA-Stoffwechsels der Zellen durch die Milzfraktion wurde die Protein/DNA-Relation bestimmt. Gemessen wurde die absolute Menge von Protein und DNA von Yac-Zellen. Eine deutliche Zunahme des Proteingehaltes ($p < 0.024$) und eine geringe Abnahme des DNA-Gehaltes ($p < 0.138$) konnte festgestellt werden (Abb. 5).

Die Umwandlung vom proliferierenden zum nicht proliferierenden Zustand führt die Zelle zu einer Umstellung der Pro-

teinbiosytheserate und der Degrationsrate des Proteins. Papadopoulos und Pfeifer (1987) demonstrierten, daß weniger Proteine in den wachstumsgehemmten 3T3-Zellen synthetisiert werden als in den proliferierenden. Ferner werden auch mehr Proteine in den wachstumsgehemmten 3T3-Zellen abgebaut.

All diese Ergebnisse deuten auf einen stimulierenden Mechanismus bzw. auf einen stimulierenden Faktor. Ob dieser das einzig wirkende Agens in der Milzfraktion ist und wie der Wirkungsmechanismus ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Arbeiten wurden unterstützt durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie, Nr. 031 7056A.

Tabelle 1: Vergleich der allgemeinen Eigenschaften von Pyruvat-Kinasen (unter Verwendung einzelner Daten von Hall und Cottam, 1978; Noguchi, 1988).

Isoenzyme	L	R	M ₁	M ₂
Mol. Gewicht (kDa)	193-26	200-240	212-250	190-250
S-Konstante	9.4-10.0	7.8	9.2-10.4	9.3-10.8
Untereinheiten	4	4	4	4
Mol. Gewicht der Untereinheiten (kDa)	50-62	59-62	53-63	50-62
Km für PEP (mM)	0.3-0.96	0.5-1.4	0.04-0.09	0.2-0.4
Hill-Koeffizient	1.6-2.9	1.2-1.6	1.0	1.3-1.5
Kinet. Kurve	sigmoid	sigmoid	hyperbol.	sigmoid
Aktivieren durch FDP, Ka (mM)	ja (0.06-0.1)	ja (0.04-0.06)	nein (0.1-0.4)	ja
Km für ADP (mM)	0.1-0.4	0.4-0.6	0.3-0.4	0.2-0.4
I _{0.5} für ATP (mM)	0.1-0.153.0-3.7		2.5	0.5
Inhibieren durch L-Ala, I _{0.5} (mM)	ja (1.0-10)	ja	nein	ja (0.6)
cAMP abhängig	ja	ja	nein	nein
pH Optimum ohne FDP	6.5		7.1-7.5	
mit FDP	6.8-7.0		7.1-7.5	
pI ohne FDP	5.8-6.3	7.1	8.5-8.9	5.6-8.3
mit FDP	5.2-5.3		8.5-8.9	6.7
N-Terminus	blockiert		blockiert	blockiert
Immun. Charakter *:				
Anti-Typ-L	+	+	-	-
Anti-Typ-R	+	+	-	-
Anti-Typ-M ₁	-	-	+	+
Anti-Typ-M ₂	-	-	+	+

* "+" bedeutet eine Antigen-Antikörper-Reaktion, und "-" bedeutet keine Antigen-Antikörper-Reaktion.

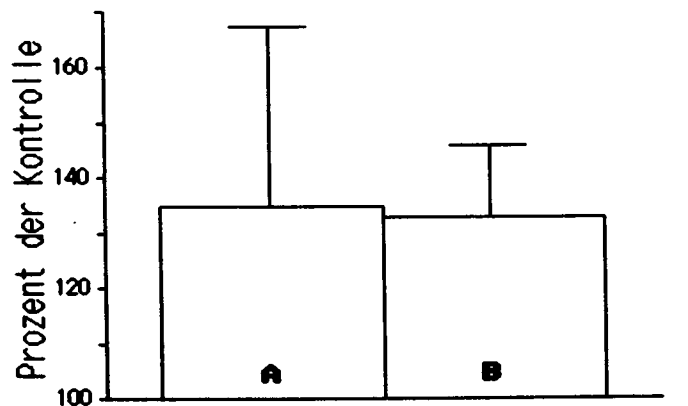


Abb. 1:

Aktivitäten der Phosphofruktokinase und Hexokinase von SV40-3T3-Zellen nach der Behandlung mit der Milzfraction (200 $\mu\text{g/ml}$). A: PFK; B: HK

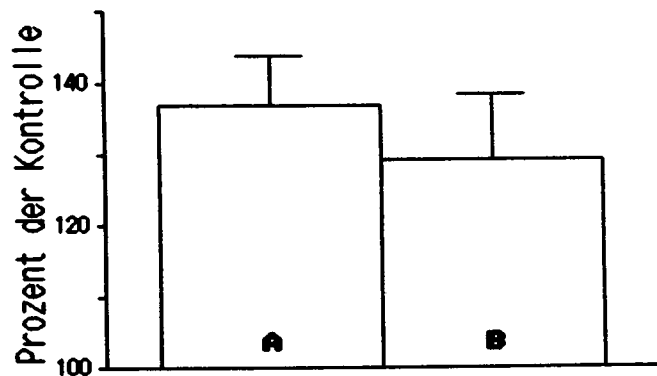


Abb. 2:

Aktivitäten der Pyruvat-Kinase und Na/K-ATPase von Yac-Zellen nach der Behandlung mit der Milzfraction (200 $\mu\text{g/ml}$). A: Pyruvat-Kinase; B: Na/K-ATPase

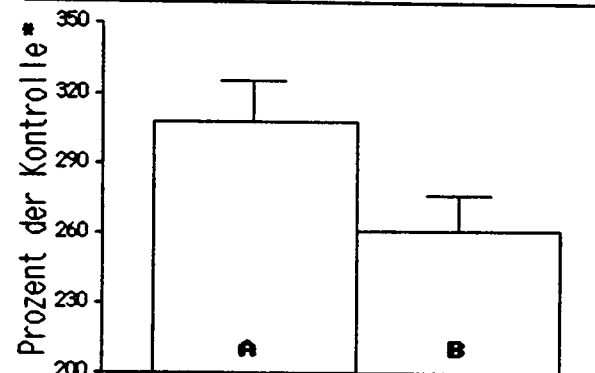


Abb. 3:

Aktivierung der Pyruvat-Kinase-Aktivität von Yac-Zellen durch 2.5 mM F-1,6- P_2 . A: unbehandelte Zellen + FDP; B: mit der Milzfraction behandelte Zellen + FDP. Kontrolle bedeutet hier die jeweilige Enzymaktivität ohne FDP.

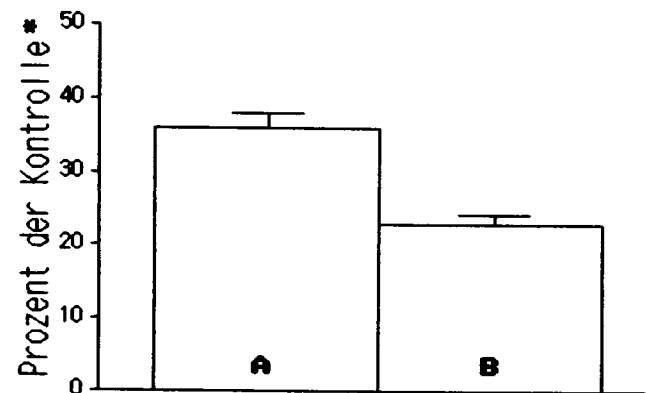


Abb. 4:

Hemmung der Pyruvat-Kinase-Aktivität von Yac-Zellen durch 2.5 mM L-Alanin. A: unbehandelte Zellen + L-Alanin; B: mit der Milzfraction behandelte Zellen + L-Alanin. Kontrolle bedeutet hier die jeweilige Enzymaktivität ohne L-Alanin.

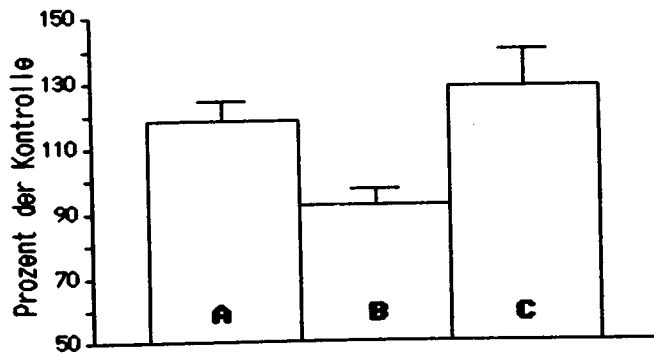


Abb. 5:

Protein- und DNA-Gehalt von mit der Milzfraktion behandelten Yac-Zellen. A: Proteingehalt; B: DNA-Gehalt; C: Protein/DNA-Relation

Literatur

- Audhya T., Schlessinger D.H., Goldstein G. (1987) Isolation and complete amino acid sequence of human thymopietin und spenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3545-3549
- Bennett M.J., Timperley W.R., Taylor C.B., Shirley Hill A. (1978) Isoenzymes of hexokinase in the developing normal and neoplastic human brain. Eur. J. Cancer 14, 189-193
- Bustamante E., Pedersen P.L. (1977) High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3735-3739
- Cognet M., Lone Y.C., Vaulont S., Kahn A., Marie J. (1987) Structure of the Rat L-type Pyruvate Kinase Gene. J. Mol. Biol. 196, 11-25
- Eigenbrodt E., Schoner W. (1977) Purification and Properties of the Pyruvate Kinase Isoenzymes Type L and M₂ from Chicken Liver. Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem. 358, 1033-1046
- Eigenbrodt E., Schoner W. (1979) Modification of Pyruvate Kinase Activity by Proteins from Chicken Liver. Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem. 360, 1243-1252
- Eigenbrodt E., Glossmann H. (1980) Glycolysis-one of the keys to cancer? Trends Pharmacol. Sci. 1, 240-245
- Fetsch J., Maurer H.R. (1987) A specific, low molecular mass granulopoiesis inhibitor, isolated from calf spleen. In: Najman A. & Guigon M. (eds.): The Inhibitors of Hematopoiesis. Vol. 162, pp. 55-58, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.
- Hall E.R., Cottam G.L. (1978) Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: Their physical, chemical, kinetic and

- immunological properties. *Int. J. Biochem.* 9, 785-793
- Harada K., Saheki S., Wada K., Tanaka T. (1978) Purification of four pyruvate kinase isozymes of rats by affinity elution chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 524, 327-339
- Hess B., Kutzbach C. (1971) Identification of Two Types of Liver Pyruvate Kinase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 453-458
- Hsu Y.C., Bloxham D.P., Giles I.G. (1987) Phosphorylation of typ-L pyruvate kinase in intact hepatocytes. Localisation of the phosphorylation site in response to both glucagon and the Ca^{++} -linked agonist phenylephrine. *FEBS* 218, 1-6
- Imamura K., Taniuchi K., Tanaka T. (1972) Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase. II. Purification of M_2 -type Pyruvate Kinase from Yoshida Ascites Hepatoma 130 Cells and Comparative Studies on the Enzymological and Immunological Properties of the Three Types of Pyruvate Kinase, L, M_1 , and M_2 . *J. Biochem.* 72, 1001-1015
- Kahn A., Meienhofer M., Cottreau D., Lagrange J.L., Dreyfus J. (1979) Phosphofructokinase (PFK) Isozymes in man. *Human Genetics* 48, 93-108
- Kamel R., Schwarzfischer F. (1975) Hexokinase isozymes in human neoplastic and fetal tissues: The existence of hexokinase II in malignant tumors and in placenta. *Human Genetics* 30, 181-185
- Katzen H.M., Schimke R.T. (1965) Multiple forms of hexokinase in the rat: Tissue distribution, age dependency, and properties. *Biochem.* 54, 1218-1225
- Kellett G.L., Robertson J.P. (1984) A protein inhibitor of phosphofructokinase from the mucosa of rat small intestine.

- stine. *Biochem. J.* 220, 601-604
- Kohl E.A., Cottam G.L. (1977) Kinetic studies with L-type pyruvate kinase from rats either fed a high carbohydrate, low protein diet or starved. *Biochim. Biophys. Acta* 484, 49-58
- Meienhofer M.C., Dreyfus J.C., Kahn A. (1983) Induction of glycolytic enzyme synthesis in proliferating fibroblasts. *Biochem. J.* 214, 195-201
- Munday K.A., Giles I.G., Poat P.C. (1980) Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B, 403-411
- Nakamura K., Kituta T., Takahashi T., Nakamura Y., Nakajima Y. (1985) A new cancer marker: A possible cancer screening method based on the suppression of phosphofructokinase by sera from cancer patients. *Cancer Detect. Prev.* 8, 207-218
- Nakamura K., Nakajima Y., Nakamura Y. (1986) Suppression of glucose utilization of murine peritoneal exudate macrophages by body fluids from cancer patients and identification of the susceptible enzyme. *J. Natl. Canc. Inst.* 77, 1035-1038
- Nelson D., Kabir F. (1986) The role of the mitochondrial outer membrane in energy metabolism of tumor cells. *Biochemie* 68, 407-415
- Noguchi T., Yamada K., Inoue H., Matsuda T., Tanaka T. (1987) The L- and R-type Isozymes of Rat Pyruvate Kinase Are Produced from a Single Gene by Use of Different Promoters. *J. Biol. Chem.* 262, 14366-14371
- Noguchi T., (1988) Structures of pyruvate kinase isozyme genes and regulation of their expressions. *Seikagaku* 60, 165-178
- Ochs R. (1988) Does calcium regulate pyruvate kinase?

TIBS 13, 1-2

- Papadopoulos T., Pfeifer U. (1987) Protein turnover and cellular autophagy in growing and growth-inhibited 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 171, 110-121
- Racker E. (1976) Why do tumor cells have a high aerobic glycolysis? *J. Cell. Physiol.* 89, 697-700
- Racker E., Johnson J.H., Thiery Blackwell M. (1983) The role of ATPase in Glycolysis of Ehrlich Ascites Tumor-Cells. *J. Biol. Chem.* 258, 3702-3705
- Reid S., Masters C. (1986) On the ontogeny and interactions of phosphofructokinase in mouse tissues. *Int. J. Biochem.* 18, 1097-1105
- Reiss N., Kanety H., Schlessinger J. (1986) Five enzymes of the glycolytic pathway serve as substrates for purified epidermal-growth-factor-receptor kinase. *Biochem. J.* 239, 691-697
- Reitzer L.J., Wice B.M., Kennell D. (1979) Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* 254, 2669-2676
- Skou J.C. (1988) Overview: The Na,K-Pump. *Methods in Enzymol.* 156, 1-25
- Slein M.W., Cori G.T., Cori C.F. (1950) A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 763-780
- Soderling T.R., Schworer C.M., El-Maghrabi M.R., Pilkis S.J. (1986) Phosphorylation of liver pyruvate kinase by Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase: Characterization of two phosphorylation sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 1017-1023
- Suzuki T., Koga N., Imamura T., Mitsui Y. (1988) A novel growth factor in rat spleen which promotes prolifera-

- tion of hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1123-1128
- Tanaka T., Harano Y., Morimura H., Mori R. (1965) Evidence for the presence of two types of pyruvate kinase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 55-60
- Taunton O.D., Stifel F.B., Greene H.L., Herman R.H. (1974) Rapid Reciprocal Changes in Rat Hepatic Glycolytic Enzyme and Fructose Diphosphatase Activities following Insulin and Glucagon Injection. *J. Biol. Chem.* 249, 7228-7239
- Tsai M.Y., Gonzales F., Kemp R.G. (1975) Physiological significance of phosphofructokinase isozymes. In: Markert C.L. (ed) *Isozymes II - Physiological Function*, Academic Press, New York, San Francisco & London, 819-835
- Ureta T. (1982) The comparative isozymology of vertebrate hexokinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 549-555
- Van Berkel T.J.C., Koster J.F., Hülsmann W.C. (1972) Distribution of L- and M-type pyruvate kinase between parenchymal and Kupffer cells of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 276, 425-429
- Verhagen J.N., Van der Heijden M.C.M., De Jong-van Dijken J., Rijksen G., Der Kinderen P.J., et al. (1985) Pyruvate Kinase in Normal Human Thyroid Tissue and Thyroid Neoplasms. *Cancer* 55, 142-148
- Vora S., Halper J.P., Knowless D.M. (1985) Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: Transformation- and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Res.* 45, 2993-3001
- Warburg O. (1926) *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Springer, Berlin

- Weber G., Singhal R.L., Stamm N.B., Lea M.A., Fisher E.A. (1966) Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes: glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. *Adv. Enzym. Regul.* 4, 59-81
- Weber G. (1977a) Enzymology of cancer cells. Part one. *New Engl. J. Med.* 296, 486-493
- Weber G. (1977b) Enzymology of cancer cells. Part two. *New Engl. J. Med.* 296, 541-551
- Weinhouse S., Shatton J.B., Criss W.E., Morris H.P. (1972) Molecular forms of enzymes in cancer. *Biochemie* 54, 685-693

HELA ROTHE, AXEL WILLIG, PETER P. JAROS

Polyamine als Wachstumsmodulatoren - in vitro Untersuchungen

Kapitel 1

Das Polyamin Spermin wurde erstmals 1678 von Lewenhoeck beschrieben. Er erwähnte die Existenz von Kristallen in der Samen- und anderen Körperflüssigkeiten des Menschen. Schreiner (1878) erkannte die beschriebenen Kristalle als Phosphat einer organischen Base, das Sperminphosphat. Das Vorkommen von Spermin in hohen Konzentrationen in der Samenflüssigkeit und seine erste Isolierung aus dieser gaben ihm seinen Namen (Ladenburg und Abel, 1888). Zwischen 1923 und 1927 wurde von Dudley, Rosenheim, Rosenheim und Wrede die chemische Struktur von Spermin aufgeklärt. Gleichzeitig wurde es möglich die Substanz zu synthetisieren. Spermidin wurde erstmals aus Ochsenpankreas isoliert und seine postulierte Struktur durch Vergleich mit der bereits vorhandenen synthetischen Substanz bestätigt (Dudley et al., 1927). Die zwei anderen Polyamine Putrescin und Cadaverin fanden als Abbauprodukte von Bakterien in sich zersetzenden organischen Materialien Erwähnung. Ihre Struktur wurde wie beim Spermidin durch den Vergleich mit den synthetischen Diaminen etabliert (Ladenburg, 1886; Udransky und Baumann, 1888).

Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Polyamine ist die Aminosäure Arginin. Mit Hilfe der Arginase wird aus dieser Substanz die Aminosäure Ornithin gebildet. Unter Katalyse der Ornithin-Decarboxylase (ODC) entsteht als erstes Polyamin Putrescin. Die Synthese von Spermidin und Spermin

erfolgt durch die Anlagerung weiterer Aminogruppen (Aminopropyltransfer) unter Beteiligung einer Synthase. Als Aminopropyl-donor fungiert decarboxyliertes S-Adenosyl-methionin. Den Enzymen S-Adenosyl-methionin-Decarboxylase (SAMDC) und der ODC kommen somit die Funktionen von Schlüsselenzymen in der Biosynthese zu (Abb.1).

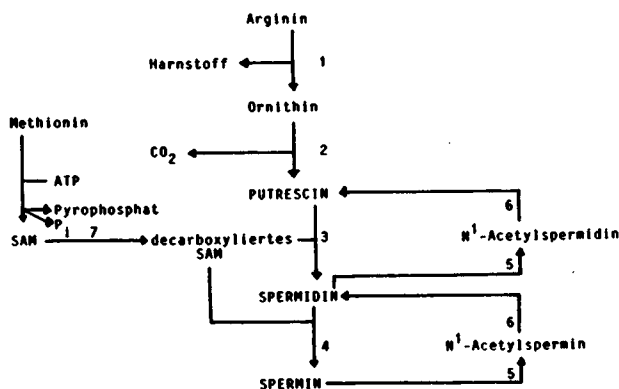


Abb. 1

Der Abbau der Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin erfolgt entweder katabolisch oder via Interkonversion, d.h. durch feed-back Regulation der Enzyme ist eine erneute Synthese der Substanzen aus ihren Abbauprodukten möglich (Abb.2: katabolischer Abbau; Abb.3: Interkonversionswege). Die gebildeten Endprodukte sind im Falle des katabolischen Abbaus N8-(2-carboxyethyl)-spermin, Sperminsäure, Putreanin, Alanin, N1-acetyliertes Spermidin und Putrescin sowie gamma-Aminobuttersäure (GABA). Durch Interkonversion entstehen Sperminsäure, Putreanin, Isoputreanin, CO₂ und Succinylsemialdehyd. Die acetylierten Polyamine, Sperminsäure und Putreanin werden über das Blutgefäßsystem in die Nieren transportiert und mit dem Urin ausgeschieden (Seiler et al., 1981).

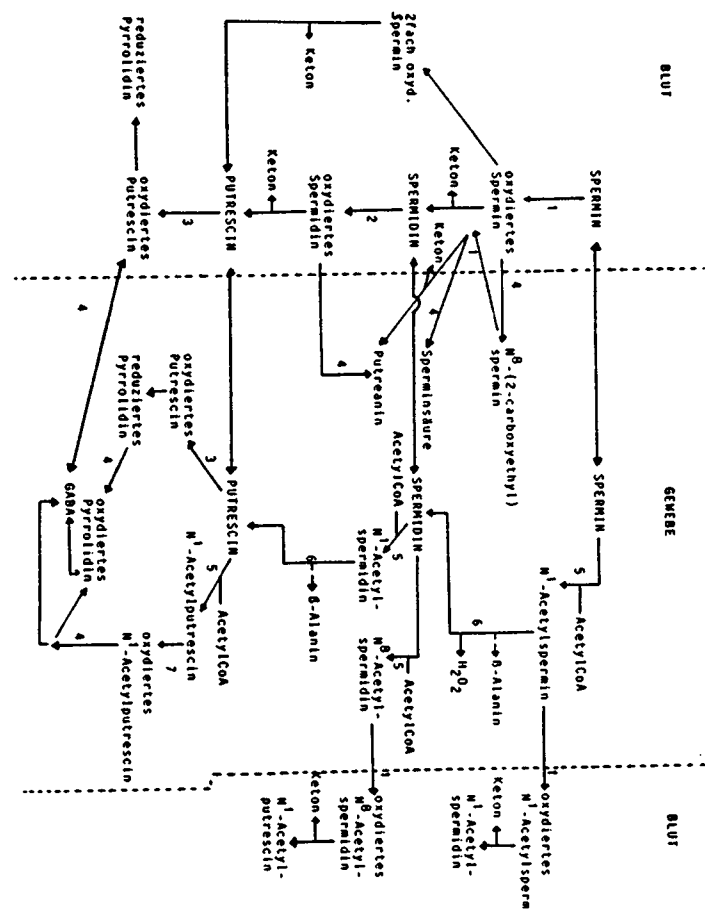


Abb. 2

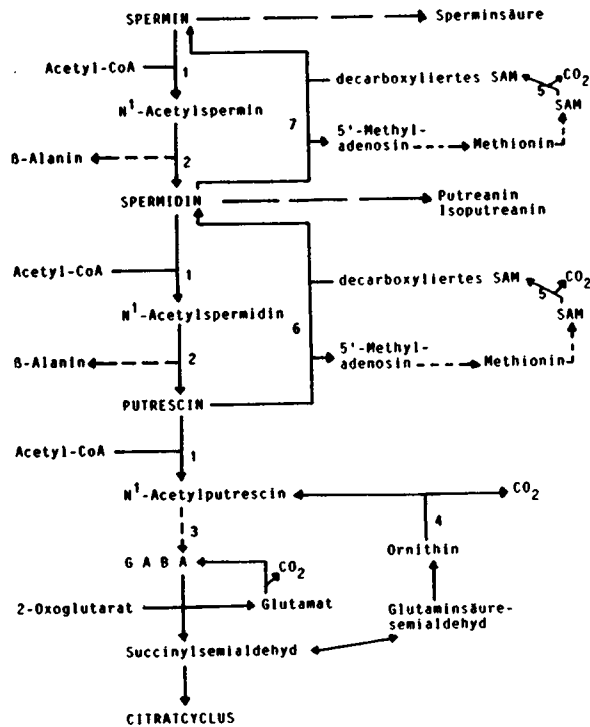


Abb. 3

Polyamine sind ubiquitär in Bakterien, Bakteriophagen, Pflanzen und tierischen Geweben unter anderem als Wachstumsfaktoren vorhanden. Als Nachweismethoden finden hier die Dünnschichtchromatographie, die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Vor- und Nachsäulenderivatisierungen mit bekannten Aminosäure-Derivatisierungsmethoden, die Gaschromatographie und Enzymassays

Anwendung. Für Bakterien gilt, daß grampositive Organismen Polyamine in niedrigen Konzentrationen enthalten, gramnegative Organismen in hohen Konzentrationen. Der intrazelluläre Gehalt ist von den Kulturbedingungen und dem zellulären Status abhängig (Tabor und Tabor, 1964). Es werden sowohl wachstumshemmende als auch wachstumsstimulierende Effekte der Polyamine auf Bakterienkulturen beschrieben (Grossowicz et al., 1955; Razin et al., 1958; Tabor und Tabor, 1976; Tabor und Tabor, 1984). Diese antagonistische Wirkung beruht auf den unterschiedlichen stoffwechselphysiologischen Leistungen der Polyamine in verschiedenen zellzyklischen Situationen. Tabor und Tabor (1964) erwähnen eine starke Proliferationshemmung in Bakterienkulturen, die unter Verwendung von 1,4-Diaminobutan, inorganischen Kationen, Nucleinsäuren, Mononucleotiden, Lecithin und basischen Aminosäuren aufzuheben ist.

Auch für Vertebraten und somit für den Menschen sind Polyamine für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung essentiell. Russell (1983) zeigte an Herzmuskelzellen nach getrennter Stimulation der DNA- und RNA-Synthese, daß die Polyaminsynthese mit der RNA-Synthese korreliert. Gleichzeitig wird die Proteinbiosynthese stimuliert. Der hierbei zugrunde liegende Wirkmechanismus ist noch ungeklärt.

Es zeigt sich ein mit dem Lebensverlauf abnehmender Gehalt, der auf einer verminderten Zellteilung und Zelldifferenzierung beruht. Die Polyamingehalte verschiedener humaner und tierischer Gewebe sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben. Die humanen Plasmawerte liegen bei 0,30 nmol/ml Blut, die Serumwerte bei 0,60 nmol/ml Blut (Russell, 1983). Von den zahlreichen Funktionen der Polyamine im Blut sei ihre Wirkung auf die Gerinnung heparinisierten Blutes hervorzuheben: a.) Spermin verkürzt die Koagulationszeit von heparinisiertem Blut; b.) Spermin verlängert die Koagulationszeit von nicht heparinisiertem Blut. Die bioche-

mischen Wechselwirkungen zwischen Polyaminen und Heparin sind bisher noch ungeklärt (Tabor und Rosenthal, 1956).

In vitro zeigen Polyamine stabilisierende Effekte auf verschiedene zelluläre und subzelluläre Komponenten und auf Nucleinsäuren. Diese Tatsache läßt sich durch die kationische Natur der Substanzen und durch ihre hohe Affinität für zelluläre Anionen erklären. Einige Effekte der Polyamine können mit denen erhöhter Ca- und Mg-Werte verglichen werden. Magnesium und Polyamine bewirken an der Mitochondrienmembran eine Stabilisierung durch Neutralisierung der Mitochondrienoberfläche durch Bindung der Polyamine mit den Phospholipiden. Die Membran wird impermeabel und widerstandsfähiger gegen erhöhte mechanische Beanspruchung (Tabor und Tabor, 1964). Die Stabilisierung von Nucleinsäuren basiert auf einer Komplexbildung zwischen den basischen Aminogruppen der Polyamine und den sauren Phosphatgruppen der Nucleinsäuren. Die damit einhergehende Neutralisierung der Phosphatgruppen bewirkt einen Nettoanstieg der Anziehungskräfte (van der Waals, Wasserstoffbrückenbindungen) und so eine Verstärkung der Sekundärstrukturen wie z.B. DNA-Doppelhelix. Diese Effekte sind denen von Histonen, Protaminen und Polylysinen ähnlich (Tabor und Tabor, 1964).

Neben den stabilisierenden Effekten auf zelluläre Komponenten fungieren die Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin als Wachstumsfaktoren in verschiedenen Eukaryoten-Zellkulturen. Bei einer Zelllinie von chinesischen Hamstern in definiertem Medium können sie Fetuin, Linolsäure und Serumalbumin ersetzen (Ham, 1964). Ausser in ihrer Funktion als Wachstumsfaktoren beeinflussen Polyamine auch andere biochemische Stoffwechselprozesse. So können sie in vitro einerseits einen Antihistamin-Effekt hervorrufen (Adams und Newberry, 1961; Jadassohn et al., 1944; Kovacs und Juhasz, 1952) andererseits auch als Hista-

min-Releaser auftreten (Amann und Werle, 1956) oder die Effekte von exogem Histamin verstärken (Parot, 1948).

Von besonderem Interesse erscheint die Tatsache, daß embryonales Gewebe einen höheren Polyamingehalt als adultes Gewebe aufweist. Russell (1983) fand, daß embryonale Gewebe einen erhöhten Polyaminlevel haben. Es zeigt sich, daß auch proliferierende Gewebe in adulten Organismen und Tumorgeweben erhöhte Polyamingehalte und eine erhöhte ODC-Aktivität aufweisen (Pegg und McCann, 1988). Den Polyaminen kommt also auch in der Tumorbologie eine besondere Bedeutung zu. So zeigen sich bei Tumorpatienten im Blut erhöhte Polyaminwerte (Tab.3) und sie scheiden vermehrt Polyamine mit dem Urin aus (Tab.4). Dieses wird von einigen Arbeitsgruppen in der Diagnostik zur Früherkennung maligner Zell-/Gewebeformationen genutzt (Russell et al., 1971; Gehrke et al., 1974; Fleisher und Russell, 1975).

In der Therapie finden mit Difluoromethylornithin (DFMO) und Methyl-glyoxal-bis-guanylhydrazon (MBGB) Substanzen Anwendung, die die Schlüsselenzyme ODC und SAMDC irreversibel hemmen (Manni et al., 1989; Hibasami et al., 1989). Pegg et al. (1989) zeigten, daß bis-ethyl-Derivate von Spermin und Spermidin die ODC und die SAMDC über eine Aktivitätsminderung und über eine Verminderung des Enzymproteins hemmen. Das Spermidin-Strukturanalogon Norspermidin (Abb.4) hemmt in vivo die ODC, nicht die SAMDC. Ein Antitumoreffekt wird alleine oder in Kombination mit DFMO in Mäusen gegen 1210-Leukämiezellen, 3LL-Carcinom- und EL4-Lymphomzellen erzielt. In vitro zeigt Norspermidin auf HeLa-Zellen eine antiproliferative Wirkung, obwohl in vitro die ODC nicht gehemmt wird. Der Effekt beruht auf einer Arretierung der Zellen in der Mitose (Sunkara et al., 1988). Die bisherigen Befunde sprechen für eine Nutzung von Polyaminanaloga als Antitumoragentien, für ihre Verwendung als Medikamente müssen sie jedoch

wegen unerwünschter Nebenwirkungen modifiziert und verbessert werden (Porter und Bergeron, 1988).

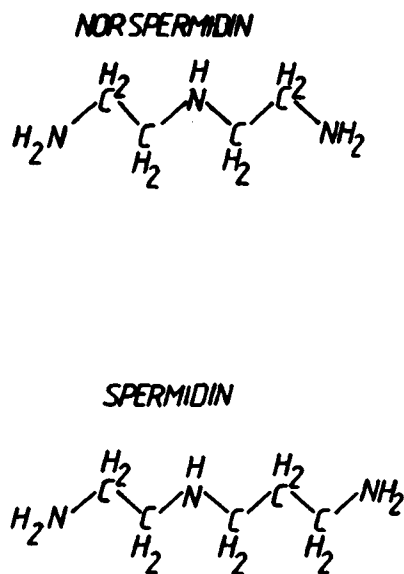


Abb. 4

Die zentrale Rolle der Milz im immunbiologischen Geschehen (siehe Beitrag P.P.Jaros und W. Dittrich in diesem Band) und die Tatsache, da die Milz einen relativ hohen Gehalt an Polyaminen aufweist, läßt es als notwendig erscheinen, die Wechselwirkung von Zellwachstum und Polyaminkonzentrationen in Milzextrakten *in vitro* zu untersuchen. Im Milzextrakt M1 (Herstellung siehe Beitrag Dittrich et al. in diesem Band; FPLC-Profil siehe Abb. 5) wurde der Gehalt der Polyamine quantifiziert. Mittels Vorsäulenderivatisierung mit Dansylchlorid ließen sich Spermin, Spermidin, N1-Acetylspermin, N1-Acetylspermidin, N8-Acetylspermidin und N1-Acetylputrescin nachweisen (Tabelle 5). Ihre

Identifizierung erfolgte über die Bestimmung der Elutionszeiten interner Standards (Abb.6). Der Gesamtanteil von Polyaminen im M1-Extrakt beläuft sich auf ca. 16 %. Diese relativ hohe Konzentration bewirkt *in vitro* unter Verwendung von foetalem Kälberserum (FCS) einen cytotoxischen Effekt, der auf die Anwesenheit von Aminoxidasen zurückzuführen ist. Diese Enzyme oxidieren Polyamine, wobei H_2O_2 entsteht (Seiler et al., 1981; Casero et al., 1989). Das Peroxid ist der Träger des cytotoxischen Effekts. Wird statt FCS das Aminoxidase-freie Pferdeserum verwendet, ist ebensowenig eine Proliferationshemmung zu beobachten wie bei Verwendung des Aminoxidase-Inhibitors Aminoguanidin (Abb.7). Der H_2O_2 generierende cytotoxische Prozeß kommt bei den relativ geringen Polyaminkonzentrationen, die sich im FCS befinden bzw. essentieller Bestandteil herkömmlicher Zellkulturmedien (z.B. RPMI 1640, DMEM) sind (Ginty und Seidel, 1989), nicht zum Tragen. Eine Erklärung wäre, daß die Anwesenheit von polyaminbindenden Anionen im FCS und/oder die hohe Pyruvatkonzentration der Kulturmedien als H_2O_2 -Puffer eine "neutralisierende" Wirkung haben oder daß die Polyamine im Serum bereits oxidiert sind und das H_2O_2 durch Peroxidasen entschärft wurde.

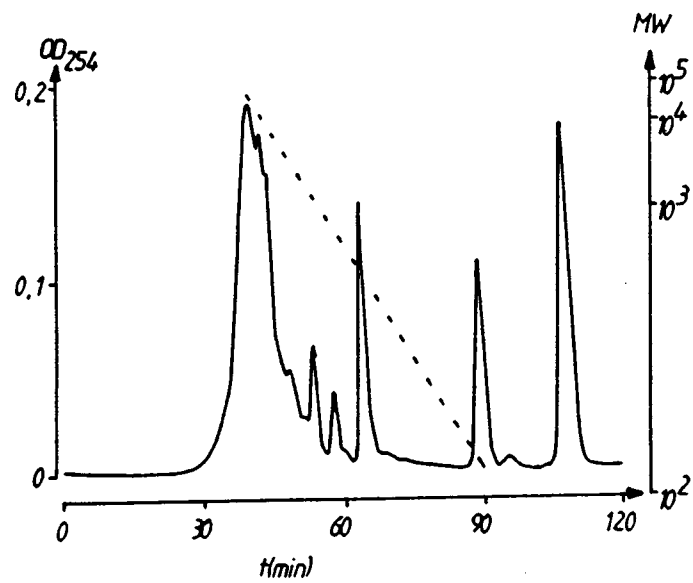


Abb. 5

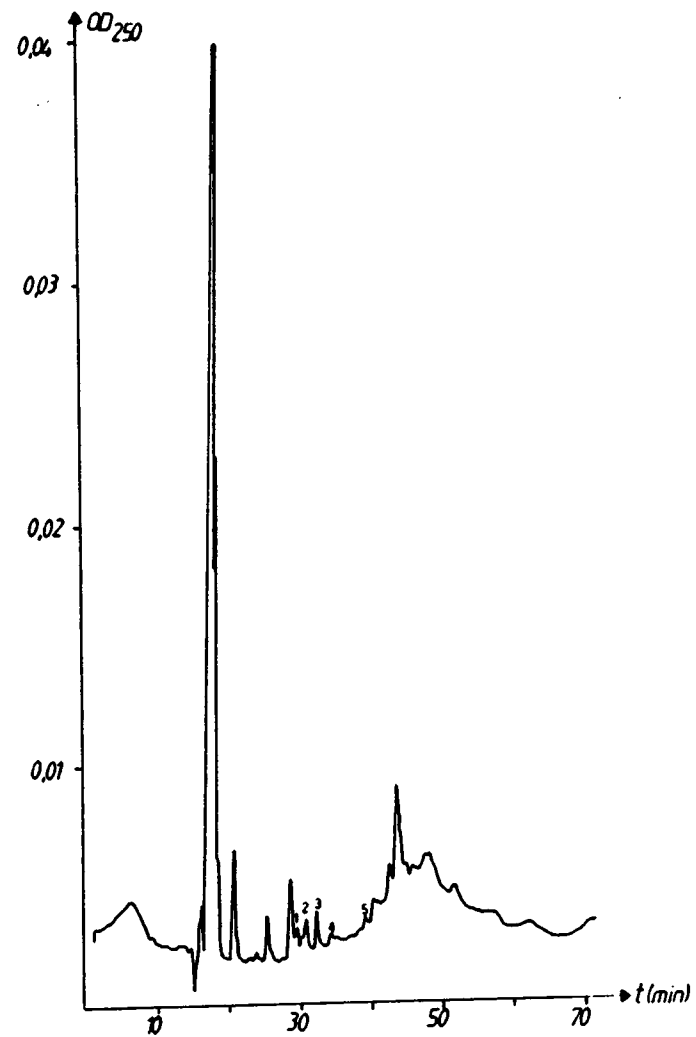


Abb. 6

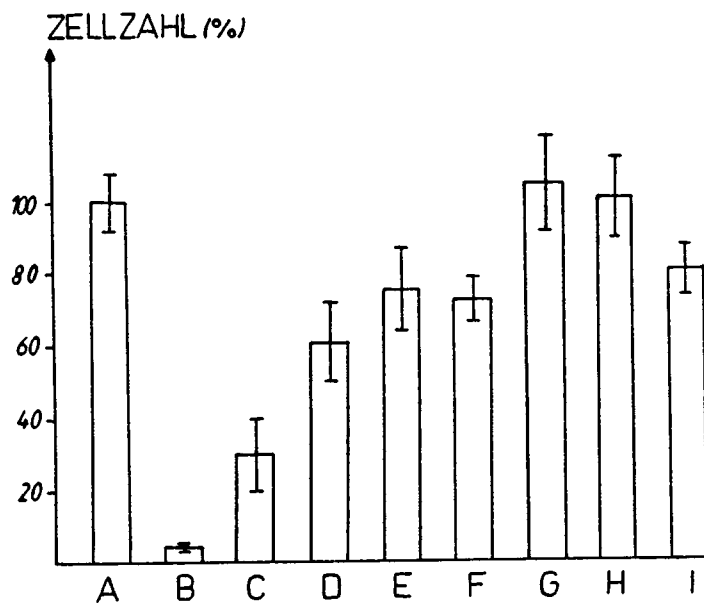


Abb. 7

Kapitel 2

Um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß Spermin unter verschiedenen Bedingungen von Yac-1-Zellen aufgenommen wird, wurde ^{14}C -Spermin den Zellen in Anwesenheit von FCS und Pferdeserum im Inkubationsmedium angeboten. Innerhalb von 60 Minuten nehmen die Zellen in Anwesenheit von foetalem Kälberserum und Pferdeserum ca. 0,2 attomol ($= 2 \times 10^{-19}$ mol) pro Zelle auf. Eine Präinkubation mit Polyaminen in derselben Zusammensetzung wie in M1 verhindert die Aufnahme von ^{14}C -Spermin in die Zellen fast vollständig. Diese Wirkung könnte dadurch erklärt werden, daß durch die Vorinkubation mit dem Polyamingemisch die Zellen bereits ihre Kapazität für die Aufnahme exogener Polyamine erschöpft haben und deshalb das markierte Spermin nicht mehr aufnehmen können. Dieser Hemmeffekt tritt bei der Zugabe von M1 zum Inkubationsmedium trotz des hohen Polyamingehaltes nicht auf (Abb.8). In dem Milzextrakt liegen die Polyamine vermutlich an Proteine oder andere Bestandteile des Extraktes gebunden vor. Dadurch sind sie für die Zellen nicht frei verfügbar. Es ist wahrscheinlich, daß die "geblockten" Polyamine in M1 zunächst durch im Medium vorhandene Substanzen verfügbar gemacht werden müssen. Erst dann können sie von den Zellen aufgenommen werden. Dieser Prozeß scheint einen längeren Zeitraum als 60 Minuten in Anspruch zu nehmen. Yac-1-Zellen, die mit M1 präinkubiert wurden, nehmen Polyamine unvermindert auf. Diese Versuchsergebnisse lassen sich mit den Befunden von Toninello et al. (1988) und Marsh et al. (1988) vergleichen. Rattenlebermitochondrien zeigen eine lineare Aufnahme von bis zu 50-60 nmol ^{14}C -Spermidin pro mg Zellprotein innerhalb von 20-30 min. Exogenes Acetat (20 mM) verlangsamt und minimiert die Aufnahme von ^{14}C -Spermidin (Toninello et al., 1988), Lipopolysaccharide (LPS) hingegen stimulieren die Aufnahme

exogener Polyamine (Marsh et al., 1988). In humanen Milzzellkulturen wird die Aufnahme exogener Polyamine durch Hexamethylenbisacetamid (HMBA), einen spezifischen Inhibitor der B-Lymphocyten-Aktivierung, gehemmt (Marsh et al., 1988).

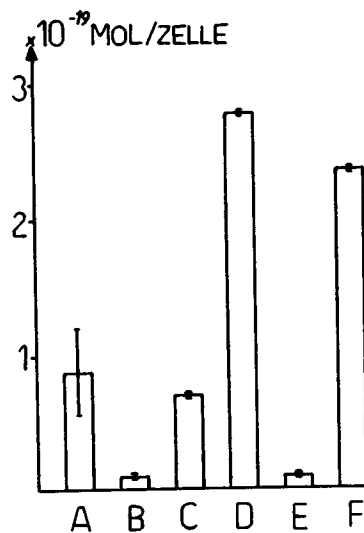


Abb. 8

Trotz des Vorliegens zahlreicher Befunde und einer zunehmend intensiveren Forschung auf dem Gebiet des Polyaminstoffwechsels, stehen doch viele Ergebnisse noch isoliert und lassen sich nicht in ein übergreifendes Konzept integrieren (Zappia und Pegg, 1988). Die unbestrittene Bedeutung der Polyamine für die zelluläre Regulation läßt sich unter anderem an folgenden Sachverhalten zeigen. Calmodulin und andere Ca-bindende Proteine steuern das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (siehe Beitrag R. Michael in diesem

Band). Spermin, Spermidin und Putrescin inhibieren in vitro die Ca-Pumpe durch Stimulation der Phospholipase und Calmodulin (Missiaen et al., 1989) und modulieren die Ca-Aufnahme in Mitochondrien (Khan et al., 1989a; Khan et al., 1989b) sowie den Calmodulinstoffwechsel (Jensen et al., 1989a; Jensen et al., 1989b).

Polyamine regulieren in verschiedener Art und Weise die Enzyme ODC und SAMDC. 0,1 mM Spermin hemmt in Tumorzellen die SAMDC (Stoschek et al., 1982) über eine Inhibition der DNA-Transkription zu SAMDC-mRNA und über eine Hemmung der Translation der SAMDC-mRNA (Persson et al., 1988). Spermidin inhibiert ebenfalls die Translation der ODC- und der SAMDC-mRNA sowie die Transkription der SAMDC-mRNA. Gleichzeitig stimuliert es Antizym, einen Proteinmodulator der ODC-Synthese. Auch Putrescin regt die Antizym-Aktivität an und hemmt die ODC Translation. Die SAMDC-Synthese aus einem 37kDa Proenzym und die Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin (SAM) wird durch Putrescin stimuliert (Persson et al., 1988). Spermidin stellt ein Zwischenprodukt in der Synthese von Hypusin dar, das als posttranslationale Modifikation eines Eucaryoten-Translationsinitiationsfaktors gebildet wird (Pegg und McCann, 1988). Exogenes Putrescin beeinflusst in vitro in Epithelialzellen (IEC-6) die DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese. Die Putrescin Synthese und/oder Transport während der Proliferation der Zellen stimuliert die o.g. Prozesse (Ginty et al., 1989). In vivo inhibieren Histamin und Serotonin bei Ehrlich-Ascites-Tumoren die ODC-Induktion bis zu 91 % (Mates et al., 1989). Auch zwischen der Induktion neoplastischen Wachstums durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und der ODC-Aktivität besteht ein enger Zusammenhang (Gawel-Thompson und Greene, 1989). Mit EGF behandelte embryonale mesenchymale Zellen der Maus zeigen eine erhöhte ODC-Aktivität und eine Stimulation des Putrescin-Transportme-

chanismus. Der ODC-Inhibitor DFMO reduziert in vitro den intrazellulären Putrescin- und Spermidin-Level bei LLC-PK1 renalen Epithelial-Zellen. Nach Zugabe von exogenem Putrescin wurde die DNA-Synthese eingeleitet und als Folge die Mitose. Durch die Vorbehandlung mit DFMO wurde die Aufnahmekapazität der Zellen für Putrescin gesteigert. Die Putrescin-Aufnahme über Na-abhängige und -unabhängige Transportmechanismen wurde durch MBGB, Spermin und Spermidin gehemmt (DeSmet et al., 1989). Eine Induktion von cytotoxischen T-Lymphocyten durch DFMO in vivo und in vitro ist möglich, wodurch auch die Beeinflussung des Immunsystems durch Polyamine und/oder ihre Synthesehemmer an Bedeutung gewinnt (Bowlin et al., 1989). Das Methylglyoxal-bis-(cyclopentylamidino)hydrazon (MGBCP) hemmt die SAMDC und die Spermidin-Synthase. Dadurch wird in vitro das Wachstum von Humanleukämie-Zellen inhibiert. Dabei zu beobachtende Veränderungen sind abgesenkte intrazelluläre Spermidin- und Spermin-Level, sowie eine unterdrückte Proteinbiosynthese. Die DNA- und RNA-Synthese wurde nicht beeinflusst. In vivo wurden bei Mäusen mit implantierten P388-Leukämie-Ascites-Zellen durch MGBCP-Administration das intrazelluläre Spermin und Spermidin minimiert und die Überlebenszeit verlängert (Hibasami et al., 1989). Der Spermidin-Synthase-Inhibitor S-Adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctan (SADATO) bewirkt bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in vitro einen Abfall des intrazellulären Spermidin-Gehaltes und eine Akkumulation von Spermin und Putrescin. Das Enzym hat keinen Effekt auf die SAMDC und auf die ODC. Ein Abfall des intrazellulären Spermin-Gehaltes und eine Akkumulation von Spermidin wird durch einen Spermin-Synthase-Inhibitor erzielt. Wiederum bleibt die ODC-Aktivität unbeeinflusst, woraus zu schließen wäre, daß die Regulation der ODC und der SAMDC nicht als eine Funktion der Polyaminstruktur zu sehen ist, sondern vielmehr die Biosyn-

these der Polyamine ein Feedback-regulierter Prozeß auf verschiedenen Ebenen ist (Holm et al., 1989). Die ^{14}C -Spermin-Inkorporation in humane Lymphocyten ist ein pH-Wert-, Zeit- und Konzentrationsabhängiger Prozeß (Fasulo et al., 1988). Des weiteren werden die Lactatbildungsrate und der Glucose-Metabolismus durch exogene Polyamine gehemmt. Die Polyamine vermitteln in Fettzellen einen insulin-ähnlichen Effekt durch das bei der Oxidation gebildete H_2O_2 . Katalase hebt diesen Effekt auf (Fasulo et al., 1988). Auch in Ratten-Enterocyten ist die Spermidin-Aufnahme in vitro ein sättigungs- und temperatur-abhängiger Prozeß, der durch 1 mM KCN und durch 1 mM Ouabain inhibiert werden kann. Weitere Untersuchungen ergaben, daß für die Spermidin und für die Putrescin-Aufnahme unterschiedliche Carrier vorhanden sind. Im Gegensatz zu der Putrescin-Aufnahme ist die Spermidin-Aufnahme nicht abhängig von einem Na-Cotransport, sondern von dem elektrophysiologischen Gradienten, beeinflusst durch die Na-K-ATPase (Kumagai et al., 1989). Die Acetylierung von Polyaminen ist in der Synthese und der Degradation der Stoffe der limitierende Schritt. Ein Überschuß an Polyaminen und einer Vielzahl zellzerstörender Substanzen induzieren die Aktivität der Polyaminacetylase. Sie stimulieren das Enzym, das den Abbau der Polyamine einleitet (Pegg und McCann, 1988). Acetylierte Polyamine treten in normalen Zellen in niedrigen, oftmals nicht detektierbaren Konzentrationen auf (Wallace et al., 1988). In malignen Zellen wurden jedoch hohe Konzentrationen beobachtet, wie zum Beispiel bei Mammakarzinomen (Kingsnorth und Wallace, 1985) oder colorectalen Karzinomen (Takenoshita et al., 1984). Es gibt andererseits auch Hinweise darauf, daß acetylierte Polyamine die ODC in einem negativen feedback-Mechanismus hemmen (Marsh et al., 1988). Die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipocyten wird durch einen erhöhten Polyaminlevel gestartet, wohingegen bei Maus-Embryonalcarci-

nom-Zellen ein reduzierter Polyaminlevel die Differenzierung einleitet (Pegg und McCann, 1988).

Die Vielzahl der o.g. Effekte der Polyamine auf zellbiologische Prozesse stellt sich mitunter als widersprüchlich dar und ist aufgrund der Unvollständigkeit der gesamten durch Polyamine beeinflussten Zellprozesse nicht geklärt.

Die Arbeit wurde unterstützt durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie, Nr. 0317056A.

Tabelle 1: Polyamingehalt in verschiedenen humanen Geweben.

Organ	Spermingehalt in $\mu\text{g/g ww}$
Prostata	2,40
Knochenmark	0,73
Pankreas	0,55
Thymus	0,30
Leber	0,28
Milz	0,22
Speicheldrüse	0,16
Hoden	0,16
Niere	0,15
Magen	0,14
Hirn	0,13
Blut	0,10
Herz	0,08
Lunge	0,08
Schilddrüse	0,08
Uterus	0,08
Muskel	0,07
Ovar	0,06

modifiziert nach : Tabor und Tabor, 1964

Tabelle 2: Polyamingehalte in verschiedenen tierischen Geweben

Organ	Maus		Ratte		Schwein	
	Spd	Spm	Spd	Spm	Spd	Spm
Pankreas	1,00	2,80	1,00	8,60	1,40	2,10
Prostata	n.d.	n.d.	7,70	5,70	n.d.	n.d.
Leber	1,40	1,10	1,60	1,20	0,20	0,40
Niere	0,50	0,70	n.d.	n.d.	0,30	0,50
Hoden	n.d.	n.d.	0,40	0,50	n.d.	n.d.
Hirn	n.d.	n.d.	0,70	0,20	n.d.	n.d.
Muskel	0,10	0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Milz	n.d.	n.d.	1,15	0,57	n.d.	n.d.

n.d. = Daten liegen nicht vor

Spd = Spermidin

Spm = Spermin

modifiziert nach : Tabor und Tabor, 1964
Abe und Samejima, 1975

Tabelle 3: Polyamingehalte im Urin von Tumorpatienten

Tumor	Putrescin	Spermidin	Spermin ($\mu\text{g/ml}$ Urin)
ohne	0,11	0,12	1,54
Lungenkarzinom	2,90	1,92	2,71
hämatol. Karzinom	4,40	3,70	0,80
solides Karzinom	3,70	2,70	0,60

modifiziert nach : Pigulla und Röder, 1978

Tabelle 4: Polyamingehalte im Blut von Tumorpatienten

Tumor		Putrescin	Spermidin	Spermin (nmol/ml Blut)
ohne	Plasma	0,10	0,13	0,03
	Serum	0,23	0,33	0,04
multiples	Plasma	0,70	0,91	n.d.
	Serum	0,72	0,89	n.d.
solides	Plasma	0,14	0,18	0,05
	Karzinom Serum	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = Daten liegen nicht vor

modifiziert nach : Russell, 1983

Tabelle 5: Quantifizierung der Polyamine im Milzextrakt M1

Polyamin	$\mu\text{g/mg}$ Trockengewicht
Spermin	4,84
Spermidin	23,12
N1-Acetylspermin	16,54
N1-Acetylspermidin	0,00
N8-Acetylspermidin	110,89
N1-Acetylputrescin	6,19

Literatur

- Abe F, Samejima K (1975) New fluorometric method for determination of spermidine and spermine in tissues by thinlayer chromatography. *Anal Biochem* 67: 298-308
- Adams E, Newberry SL (1961) Solubilization by chelating agents of a particle-bound inducible dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Comm* 6: 1-6
- Amann R, Werle E (1956) Über Komplexe von Heparin mit Histamin und anderen Di- und Polyaminen. *Klin Wochenschr* 34: 207-209
- Casero RA, Celano P, Ervin SJ, Porter CW, Bergeron RJ, Libby PR (1989) Differential induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human lung cancer cells by the bis(ethyl)polyamine analogues. *Canc Res* 49: 3829-3833
- Bowlin TL, Rosenberger AL, McKown BJ (1989) Alpha - difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine biosynthesis, augments cyclosporin A inhibition of cytolytic T lymphocyte induction. *Clin Exp Immunol* 77: 151-156
- DeSmet H, Van Den Bosch L, Geuns R, Borghgraef R (1989) Polyamine transport systems in the LLC-PK1 renal epithelial established cell line. *Biochim Biophys Acta* 1012: 171-177
- Dudley HW, Rosenheim O (1925) CXLVII. The chemical constitution of spermine. II. The methylation of spermine. *Biochem J* 19: 1032-1033
- Dudley HW, Rosenheim MC, Rosenheim O (1924) The chemical constitution of spermine. 1. The isolation of spermine from animal tissues, and the preparation of its salts. *Biochem J* 18: 1263-1272
- Dudley HW, Rosenheim O, Starling WW (1926) The chemi-

- cal constitution of spermine. III. Structure and synthesis. *Biochem J* 20: 1082-1094
- Dudley HW, Rosenheim O, Starling WW (1927) The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochem J* 21: 97-103
- Fasulo L, Fulgos B, Colombatto S, Grillo MA (1988) Uptake of polyamines by human lymphocytes and their effect on lactate formation from glucose. In: Zappia V, Pegg AE (eds) *Progress in polyamine research*. Plenum Press, New York London (Advances in experimental medicine and biology, Vol 250, pp 509 -516)
- Fleisher JH, Russell DH (1975) Estimation of urinary diamines and polyamines by thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 110: 335-340
- Gawel-Thompson KJ, Greene RM (1989) Epidermal growth factor: modulator of murine embryonic palate mesenchymal cell proliferation, polyamine biosynthesis, and polyamine transport. *J Cell Physiol* 140: 359-370
- Ginty DD, Seidel ER (1989) Polyamine-dependent growth and calmodulin-regulated induction of ornithine decarboxylase. *Am J Physiol* 19: G342-G348
- Ginty DD, Osborne DL, Seidel ER (1989) Putrescine stimulates DNA synthesis in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 20: G145-G150
- Gehrke CW, Kuo KC, Zumwalt RW, Waalkes TP (1974) Determination of polyamines in human urine by an automated ion-exchange method. *J Chromatogr* 89: 231-238
- Grossowicz N, Razin S, Rozansky R (1955) Factors influencing the antibacterial action of spermine and spermidine on *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 13: 436-441

- Ham RG (1964) Putrescine and related amines as growth factors for a mammalian cell line. *Biochem Biophys Res Comm* 14: 34-38
- Hibasami H, Maekawa S, Murata T, Nakashima K (1989) Antitumor effect of a new multienzyme inhibitor of polyamine synthetic pathway, methylglyoxal-bis(cyclopentylamidino)hydrazone against human and mouse leukemia cells. *Canc Res* 49: 2065-2068
- Holm I, Persson L, Pegg AE, Heby O (1989) Effects of S-adenosyl-1,8-diamino-3-thio-octane and S-methyl-5'-methylthio-adenosine on polyamine synthesis in Ehrlich ascites-tumour cells. *Biochem J* 261: 205-210
- Jadassohn W, Fierz HE, Vollenweider H (1944) Untersuchungen über die Hemmung der durch Histamin bewirkten Kontraktion und der anaphylaktischen Reaktion durch Iminokörper. *Helv Chim Acta* 27: 1384 - 1406
- Jensen JR, Lynch G, Baudry M (1989a) Allosteric activation of brain mitochondrial Ca uptake by spermine and by Ca : developmental changes. *J Neurochem* 53: 1173-1181
- Jensen JR, Lynch G, Baudry M (1989b) Allosteric activation of brain mitochondrial Ca uptake by spermine and by Ca : brain regional differences. *J Neurochem* 53: 1182-1187
- Khan NA, Quemener V, Moulinoux JP (1989a) Characterization of Na-dependent and system A- independent polyamine transport in normal human erythrocytes. *Biochem Arch* 5: 161-169
- Khan NA, Quemener V, Moulinoux JP (1989b) Role of protein kinase C activators and inhibitors, calmodulin antagonists and membrane sialic acids in polyamine trans-

- port in murine leukemia cells. *Cell Molec Biol* 35: 215-224
- Kingsnorth AN, Wallace HM (1985) Elevation of monoacetylated polyamines in human-breast cancers. *Eur J Canc Clin Oncol* 21: 1057-1062
- Kovacs A, Juhasz E (1952) Antihistamine effects of suspended leucocytes, especially of eosinophiles. *Arch Int Pharmacodyn* 88: 383-392
- Kumagai J, Jain R, Johnson LR (1989) Characteristics of spermidine uptake by isolated rat enterocytes. *Am J Physiol* 256: G905-G910
- Ladenburg A (1886) Über die Identität des Cadaverin mit dem Pentamethyldiamin. *Ber dtsh chem Ges* 19: 2585-2586
- Ladenburg A, Abel J (1888) Über das Aethylenimin (Spermin?). *Ber dtsh chem Ges* 21: 758-766
- Lewenhoeck A (1678) *Observationes D. Antonii Lewenhoeck de natis semine genitali animalculis*. *Phil Trans* 12: 1040-1043
- Manni A, Badger B, Glikman P, Bartholomew M, Santner S, Demers L (1989) Individual and combined effects of difluoromethylornithine and ovariectomy on the growth and polyamine milieu of experimental breast cancer in rats. *Canc Res* 49: 3529-3534
- Marsh LL, Bondy PK, Canellakis ZN (1988) Polyamines in murine splenic lymphocytes. *Biochem Int* 17: 1071-1078
- Mates JM, Sanchez-Jimenez FM, Garcia-Caballero M, Nunez de Castro I (1989) Histamine and serotonin inhibit induction of ornithine decarboxylase by ornithine in perfused Ehrlich ascites tumour cells. *FEBS Lett* 250: 257-261

- Missiaen L, Wuytack F, Raeymaekers L, DeSmet H, Caesteels R (1989) Polyamines and neomycin inhibit the purified plasma-membrane Ca pump by interacting with associated polyphosphoinositides. *Biochem J* 261: 1055-1058
- Parrot J (1948) La fixation de l'histamine par les tissus du cobaye. Sa libération par une diamine. *C R Soc Biol Paris* 142: 631-633
- Pegg AE, Wechter R, Pakala R, Bergeron RJ (1989) Effect of N1,N12-Bis(ethyl) spermine and related compounds on growth and polyamine acetylation, content, and excretion in human colon tumor cells. *J Biol Chem* 264: 11744-11749
- Pegg AE, McCann PP (1988) Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atl Sci:Biochem* : 11-18
- Persson L, Holm I, Stjernbourg L, Heby O (1988) Regulation of polyamine synthesis in mammalian cells. In: Zappia V, Pegg AE (eds) *Progress in polyamine research*. Plenum Press, New York London (Advances in experimental medicine and biology, Vol 250, pp261-272)
- Pigulla I, Röder E (1978) Hochdruck-flüssig- chromatographische Bestimmung von Putrescin, Spermidin und Spermin aus Harn, *Fresenius Z Anal Chem* 293: 404-406
- Porter CW, Bergeron RJ (1988) Regulation of polyamine biosynthetic activity by spermidine and spermine analogues- a novel antiproliferative strategy. In: Zappia V, Pegg AE (eds) *Progress in polyamine research*. Plenum Press, New York London (Advances in experimental medicine and biology, Vol 250, pp677-690)

- Razin S, Cohen A, Rozansky R (1958) Antimycotic effect of spermine. *Proc Soc Exp Biol NY* 99: 459-462
- Russell DH (1983) Clinical relevance of polyamines. *C R C Crit Rev Clin Lab Sci* 18: 261-311
- Russell DH, Levy CC, Schimpf SC (1971) Polyamines in urine of cancer-patients. *Proc Am Assoc Canc Res* 12: 76
- Schreiner P (1878) Über eine neue organische Basis in thierischen Organismen. *Liebigs Ann* 194: 68-84
- Seiler N, Bolkenius FN, Rennert ON (1981) Interkonversion, catabolism and elimination of the polyamines, *Med Biol* 51: 334-346
- Stoschek CM, Erwin BG, Florini JR, Richman RA, Pegg AE (1982) Effects of inhibitors of ornithine and S-adenosylmethionine decarboxylases on L6 myoblast proliferation. *J Cell Physiol* 110: 161-168
- Sunkara PS, Zwolshen JH, Prakash NJ, Bowlin TL (1988) Mechanism of antitumor activity of norspermidine, a structural homologue of spermidine. In: Zappia V, Pegg AE (eds) *Progress in polyamine research*. Plenum Press, New York London (Advances in experimental medicine and biology, Vol 250, pp 707-716)
- Tabor CW, Rosenthal SM (1956) Pharmacology of spermine and spermidine. *J Pharmacol* 116: 139-155
- Tabor CW, Tabor H (1976) 1,4-Diaminobutane (Putrescine), spermidine, and spermine. *Ann Rev Biochem* 45: 285-306
- Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Ann Rev Biochem* 53: 749-790
- Tabor H, Tabor CW (1964) Spermidine, spermine, and related amines. *Pharmacol Rev* 16: 245-300

- Takenoshita S, Matsuzaki S, Nakano G, Kimura H, Hoshi H, Shoda H, Nakamura T (1984) Selective elevation of the N1-acetylspermidine level in human colorectal adenocarcinomas. *Canc Res* 44: 845-847
- Toninello A, Miotto G, Siliprandi D, Siliprandi N, Garlid KD (1988) On the mechanism of spermine transport in liver mitochondria. *J Biol Chem* 263: 19407-19411
- Udransky von L, Baumann E (1888) Über die Identität des Putrescins und des Tetramethylendiamins. *Ber dtsh chem Ges* 21: 2938-2941
- Wallace HM, Nuttall ME, Coleman CS (1988) Polyamine recycling enzymes in human cancer cells. In : Zappia V, Pegg AE (eds) *Progress in polyamine research*. Plenum Press, New York London (*Advances in experimental medicine and biology*, Vol 250, pp331-344)
- Wrede F (1925) Über die aus menschlichem Sperma isolierte Base Spermin. *Dtsch Med Wochenschr* 51: 24
- Zappia V, Pegg AE (1988) *Progress in polyamine research*. In : Bach N, Cohen IR, Kritchevsky D, Lajtha A, Paoletti R (eds) *Advances in experimental medicine and biology*, Vol 250, Plenum Press, New York London.

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

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

1 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 G_1 -Phase, S-Phase (in der die DNA-Synthese erfolgt), G_2 -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 G_1 -Phase beginnen, oder aber in die G_0 -Phase eintreten (Abb. 1). Ausdifferenzierte und nicht in Teilung befindliche Zellen sind in der sogenannten G_0 -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 G_1 -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 G_1 -Phase ihrerseits in drei Unterstadien

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

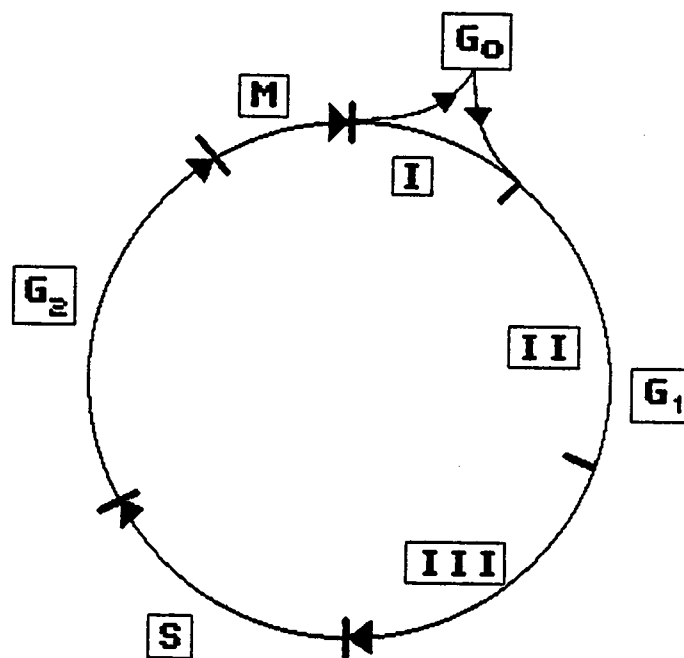


Abb. 1

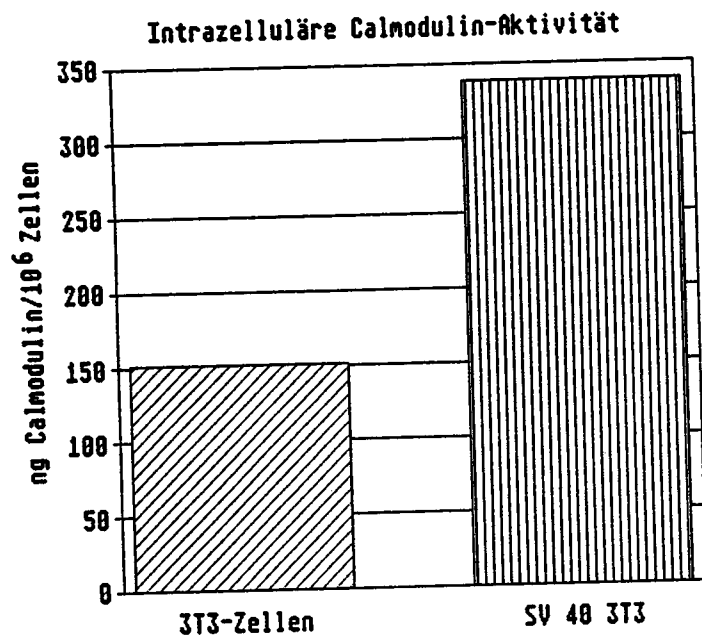


Abb. 2

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 G_i -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 Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -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. Roth et al.). Bei Lymphozyten wird das Gen für den Interleukin 2-Rezeptor auf diese Art aktiviert. Experimentell kann durch Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -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 Initiationsfaktoren 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 insensitive 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 produ-

ziert 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 Naphthalin-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 prä-neoplastische Veränderung, die die Zellen hindert, in die nicht proliferative G_0 -Phase zu gehen. Eine andere Möglichkeit, wie Zellen sich der Kontrolle durch externe Wachstumssignale 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 Ca^{2+}/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-Antigens, 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 Naphtalin-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 Monozyten. 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 Phorbol-ester 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 Ca^{2+} -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 Ca^{2+} -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). Vinculin, 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. Phorbol-ester) 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 je-

doch 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. Dittrich 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 Verdopplungszeit von 16 Stunden zur Folge. Zusätzliche Gabe von 200 μ g 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).

Wachstumskinetik von V79 - Zellen

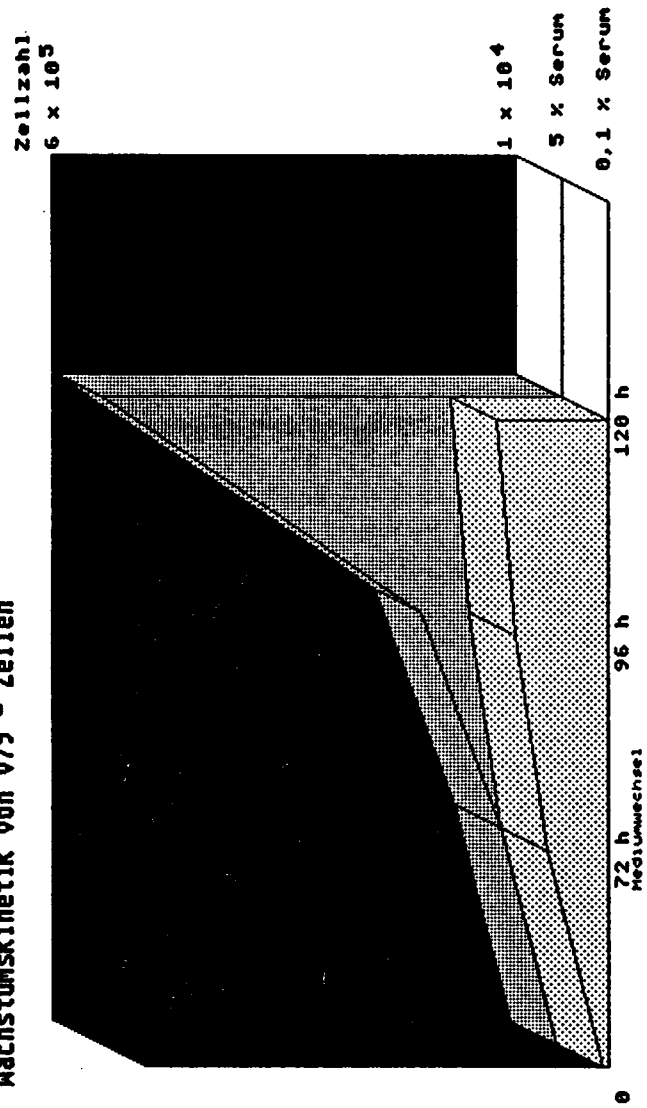


Abb. 3

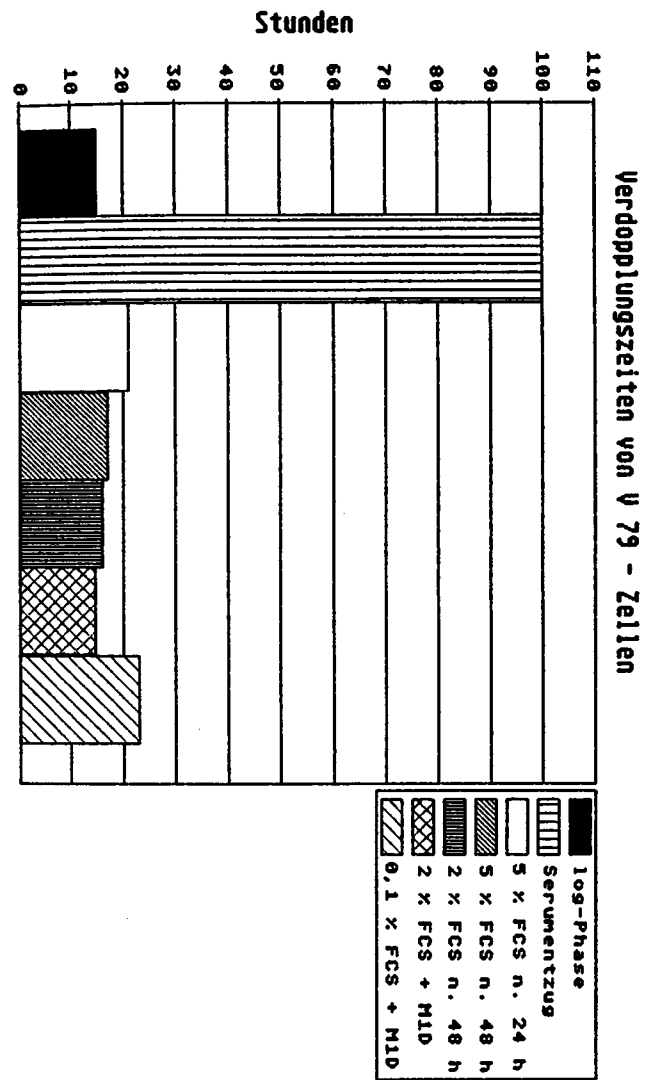


Abb. 4

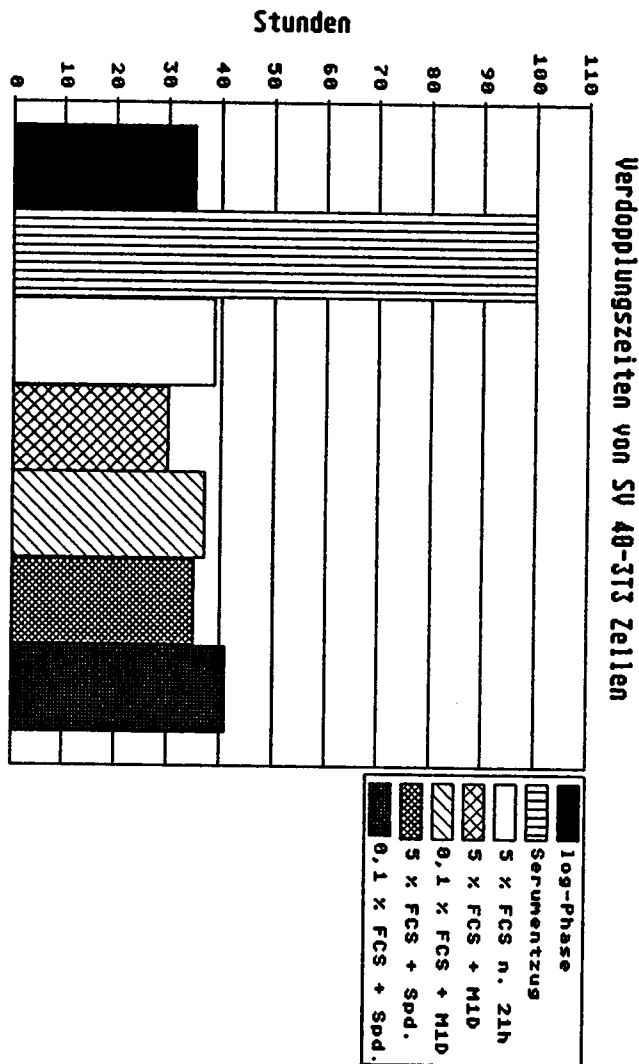


Abb. 5

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 G_1 -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 G_1 -Phase ca. 20 h und die S-Phase 8 h. Für die M-Phase lassen sich 2 h und für die G_2 -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 G_1 - und G_2 -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.

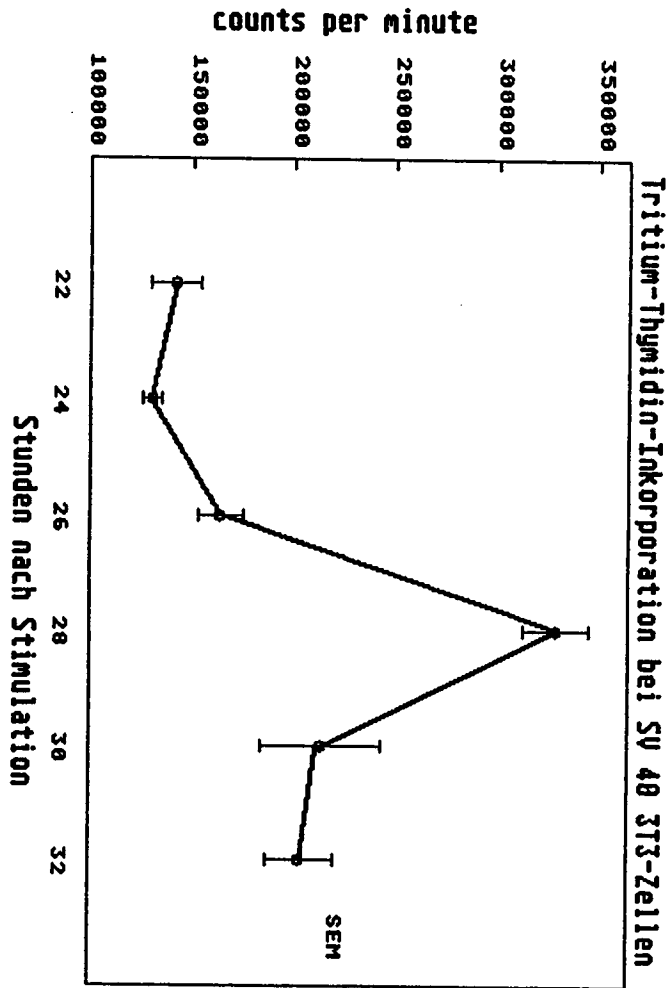


Abb. 6

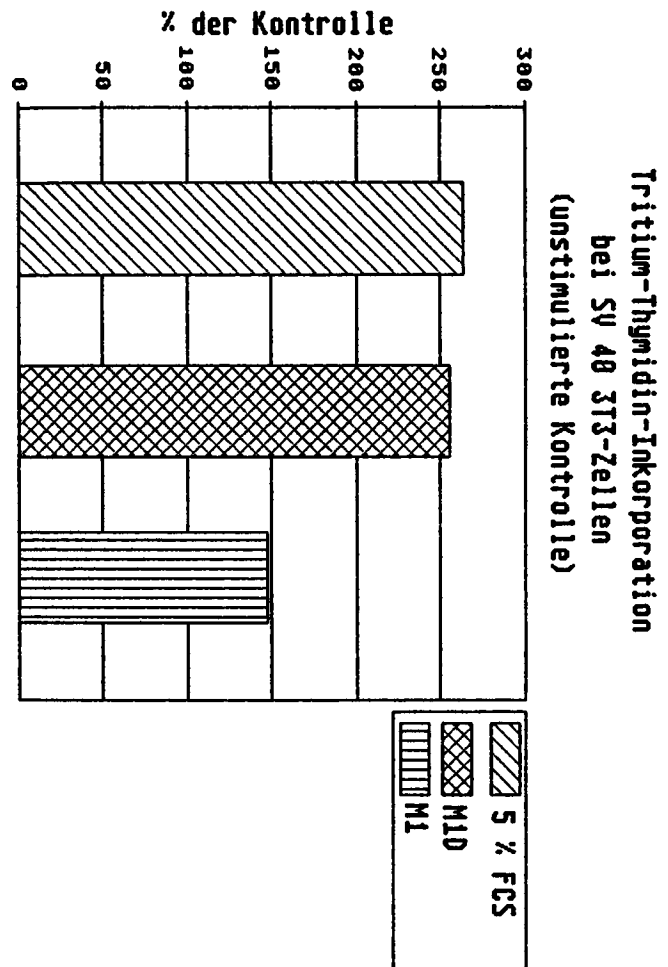


Abb. 7

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). M1D (200 µg) erhöhte die CaM-Aktivität auf ca. 320 % und lag damit deutlich über über der serumstimulierten Kontrolle. M1D 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 Aminoxydasen im FCS normalerweise H₂O₂-vermittelte zytotoxische Effekte bedingt.

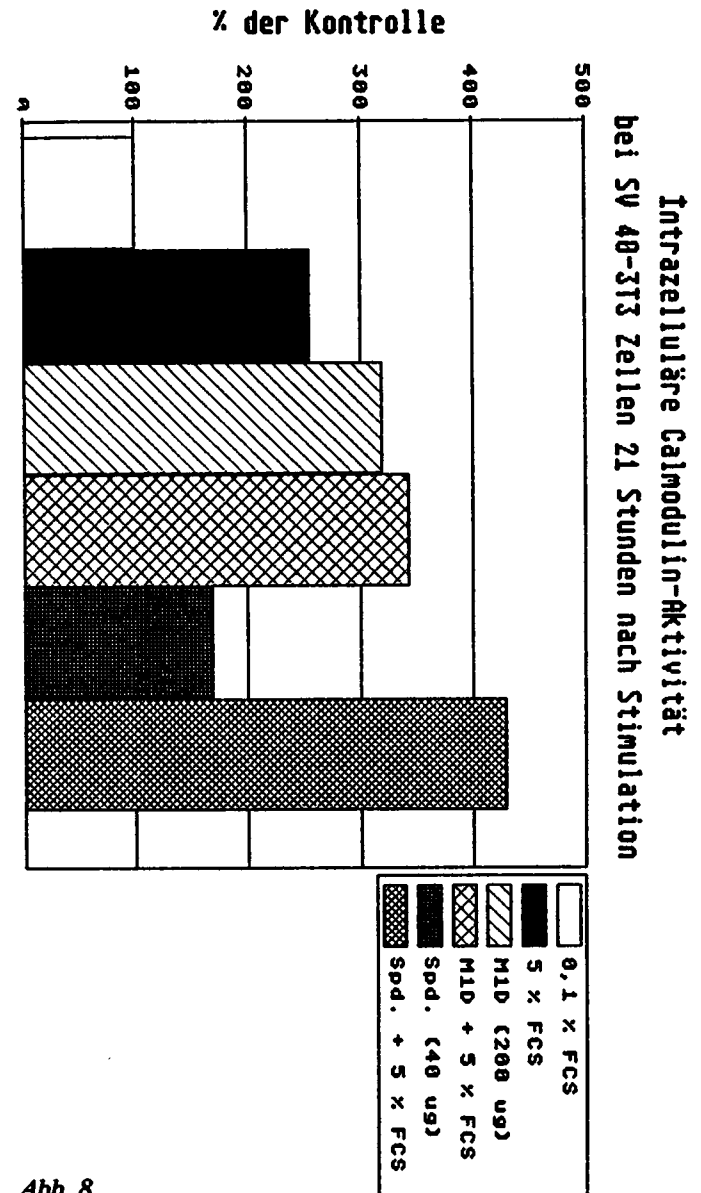


Abb. 8

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.

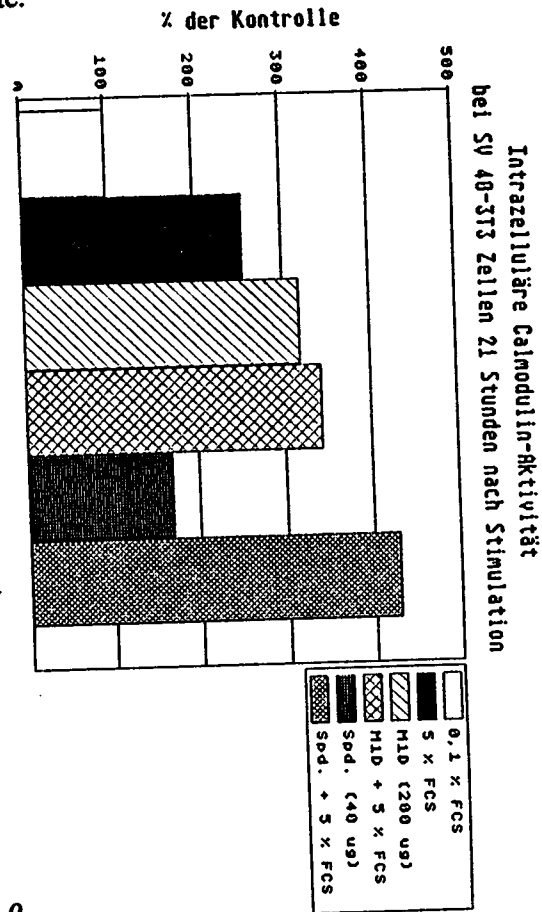


Abb. 9

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 %.

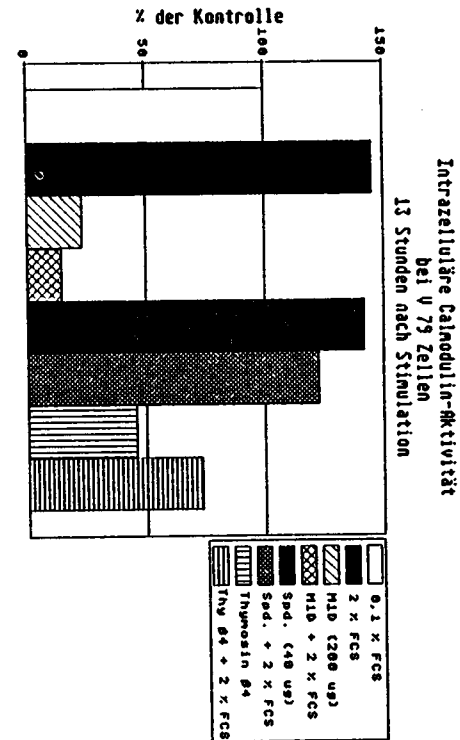


Abb. 10

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 %).

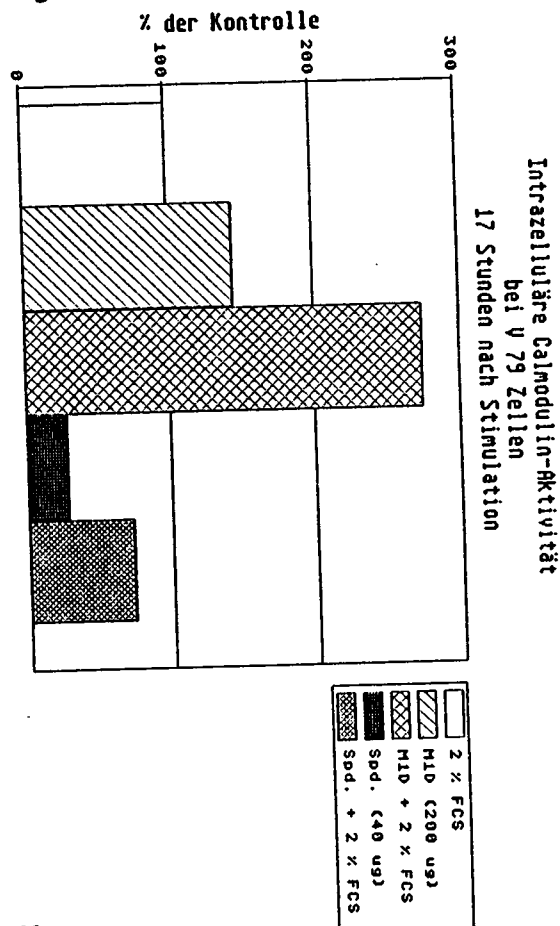


Abb. 11

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 G_1 -Phase vorzunehmen.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchen zur Zeit die Wechselwirkungen von Polyaminen mit dem Ca^{2+} /CaM-Stoffwechsel, die noch als weitestgehend unverstanden gelten können. So konnten Walters und Johnson (1988) zeigen, daß die Ca^{2+} -abhängigen Enzyme PDE und Calcineurin, eine Phosphatase, durch Spermin Ca^{2+} -unabhängig inhibiert werden können. Allerdings waren hierfür Konzentrationen im millimolaren Bereich erforderlich. Kröner (1988) konnte durch Spermin die Ca^{2+} -Aufnahme in Rattenleber-Mitochondrien erhöhen, nicht jedoch in Herz-Mitochondrien. Missiaen et al. (1989) fanden durch Polyamine eine Hemmung der Ca^{2+} -Pumpe in der Plasmamembran, die sie auf Interaktionen mit dem als zellulärem Boten fungierendem Membranlipid PIP_2 (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 (Whit-

field 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 Difuormethylornithin (DFMO) stellten 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 Ca²⁺/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, Serratosa 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-aminoethyl)-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

Die Autoren

PETER P. JAROS (1943)

Dr. rer.nat, Dipl. Biol., Akademischer Rat mit dem Schwerpunkt Neuropeptide und Neuroimmunmodulatoren. Studium der Biologie von 1967 bis 1971 in Berlin. Promotion 1975 an der Universität Ulm. Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Bonn bis 1984. Seitdem als Leiter des Isotopenlabors der Universität und Mitarbeiter der Abteilung Zoophysiologie in Oldenburg tätig.

WALTER DITTRICH (1956)

Studium der Biologie von 1982-1987 in Oldenburg, Promotion zum Dr. rer. nat. 1990. Seit 1987 in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie mit dem Schwerpunkt Wachstumsfaktoren tätig.

HELA ROTHE (1961)

Studium der Biologie von 1980-1987; seitdem als wiss. Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie mit dem Schwerpunkt Polyamine/Zellstoffwechsel tätig.

RAINER H. MICHAEL (1955)

Biologiestudium in Oldenburg; nach dem Diplom bis Dezember 1989 in der Arbeitsgruppe Zoophysiologie mit dem Schwerpunkt "Kalzium/Calmodulin" tätig. Seit 1990 in der Industrie tätig.

FANG LI (1962)

Biologiestudium in Bonn und Oldenburg. Nach dem Diplom bis August 1990 als wiss. Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe

Zoophysiologie mit dem Schwerpunkt Zellmetabolismus und mit immunologischen Fragestellungen beschäftigt.

AXEL WILLIG (1938)

Prof. Dr. rer. nat., Diplom Biologe. Studium (Biologie) in Göttingen und Giessen, danach tätig in Giessen, Liverpool, Berlin und Ulm. Seit 1976 als ordentlicher Professor an der Universität Oldenburg.

Oldenburger Universitätsreden Ansprachen • Aufsätze • Vorträge

Über die Lieferbarkeit der Ausgaben Nr. 1 bis Nr. 15 gibt auf Anfrage das Bibliotheks- und Informationssystem der Universität Oldenburg, Uhlhornsweg 49-55, 2900 Oldenburg, Tel.: 0441/798-2261 Auskunft.

- Nr. 16 Daxner, Michael: Universität Oldenburg ; eingebunden in Wirtschaft u. Gesellschaft unserer Region? - 1988. - 40 S.
ISBN 3-8142-1016-6 DM 3,00
- Nr. 17 Naßmacher, Hiltrud: Entwicklungstendenzen in der politikwissenschaftlichen Forschung : Anmerkung zum Paradigmenwechsel. - 1988. - 32 S.
ISBN 3-8142-1017-4 DM 2,00
- Nr. 18 Modelmog, Ilse: Keusches Verlangen : zur Veränderung d. Sexualverhaltens. - 1988. - 30 S.
ISBN 3-8142-1018-2 DM 2,00
- Nr. 19 Müller, Ingo: Politische Justiz im historischen Vergleich. - 1989. - 17 S.
ISBN 3-8142-1019-0 DM 3,00
- Nr. 20 Brandt, Willy: Die Nobelpreiskampagne für Carl von Ossietzky : mit d. Briefen an Konrad Reisner u. Hilde Walter / hrsg. von Wilhelm Büttemeyer. - 1988. - 68 S.
ISBN 3-8142-1020-4 DM 3,00
- Nr. 21 Jungk, Robert: Glaubhafte Ermutigung : zur Zukunft d. krit. Journalismus. - 1989. - 23 S.
ISBN 3-8142-1021-2 DM 2,00
- Nr. 22 Hartmut Böhme: Über das gegenwärtige Selbstbewußtsein der Geisteswissenschaften. - 1989. - 31 S.
ISBN 3-8142-1022-0 DM 2,00
- Nr. 23 Schmidt-Knaebel, Susanne: Frauen und Sprache : Wie gehen Frauen mit Sprache um u. wie geht d. Sprache mit Frauen um. - 1988. - 26 S.
ISBN 3-8142-1023-9 DM 2,00
- Nr. 24 Hillgärtner, Rüdiger: Von den Schwierigkeiten der Modernität : Aporet. Aspekte in frühen poetolog. Ansätzen von Joyce, Woolf, Pound u. Eliot. - 1988. - 39 S.
ISBN 3-8142-1024-7 DM 2,00
- Nr. 25 Brandt, Henry G./Daxner, Michael/Trepp, Leo: Dem Vergessen entgegnetreten ; Reden zum 50. Jahrestag d. Pogrome 1938. - 1989. - 60 S.
ISBN 3-8142-1025-5 DM 5,00
- Nr. 26 Appelius, Stefan/Wieland, Lothar: Reden zur Eröffnung des Fritz Küster-Archivs für Geschichte und Literatur der Friedensbewegung. - 1989. - 43 S.
ISBN 3-8142-1026-3 DM 3,00
- Nr. 27 Mittelstraß, Jürgen: Glanz und Elend der Geisteswissenschaften. - 1989. - 35 S.
ISBN 3-8142-1027-1 DM 4,00
- Nr. 28 Wolter, Andrä: Von der Elitenbildung zur Bildungsexpansion ; zweihundert Jahre Abitur (1788 - 1988). - 1989. - 90 S.
ISBN 3-8142-1028-X DM 6,00
- Nr. 29 Hohendorf, Gerd : Reformpädagogik und Arbeiterbewegung. - 1989. - 49 S.
ISBN 3-8142-1029-8 DM 3,00

- Nr. 30 Meves, Uwe: »Über den Namen der Germanisten«.-1989.-31 S.
ISBN 3-8142-1030-1 DM 4,00
- Nr. 31 Höpner, Thomas: Der ökologische Zustand der Deutschen Bucht und des Wattenmeeres. - 1989. - 34 S.
ISBN 3-8142-1031-X DM 4,00
- Nr. 32 Nitsch, Wolfgang: 20 Jahre Student/inn/enbewegung - *kein* Grund zum Feiern. - 1989. - 31 S.
ISBN 3-8142-1032-8 DM 4,00
- Nr. 33 Fooker, Enno: Sprach-Probleme der Pädagogik ; Anregungen zum kritischen und sensiblen Gebrauch der pädagogischen Fachsprache. - 1989. - 45 S.
ISBN 3-8142-1033-6 DM 4,00
- Nr. 34 Lucas-Busemann, Erhard: Die Ermordung Rosa Luxemburgs und Karl Liebknechts - auch nach 70 Jahren Anlaß der Trauer und des Nachdenkens. - 1990. - 72 S.
ISBN 3-8142-1034-4 DM 6,00
- Nr.35 Pankau, Johannes: Unendliche Rede - Zur Formulierung des Rethorischen in der deutschen Romantik. - 1990. - 31 S. -
ISBN 3-8142-1035-2 DM 6,00
- Nr. 36 Pekar, Thomas: Ordnung und Möglichkeit - Robert Musils 'Möglichkeitssinn' als Poetologisches Prinzip - Wachsmann-Preis 1989. - 1990. - 29 S.
ISBN 3-8142-1036-0 DM 6,00
- Nr. 37 Krems-Hemesath, Bettina: Bundesdeutsches Umweltrecht - Vorbild für europäische Luftreinhaltung auf hohem Schutzniveau? - 1990. - 48 S.
ISBN 3-8142-1037-9 DM 6,00
- Nr. 38 Knapp, Gudrun-Axeli: Zum Problem der Radikalität in der feministischen Wissenschaft. - 1990. - 27 S.
ISBN 3-8142-1039-7 DM 6,00
- Nr. 39 Prignitz, Christoph: Friedrich Hölderlin- Ideal und Wirklichkeit in seiner Lyrik. - 1990. - 33 S.
ISBN 3-8142-1039-5 DM 6,00
- Nr. 40 Kunz, Jutta: Dunkle Materie im Universum.- 1990. - 47 S.
ISBN 3-8142-1040-9 DM 6,00
- Nr. 41 Stroh, Wolfgang M.: Gibt es eine andere Musikwissenschaft? - Ideen und Projekte zum Verhältnis von Verstand und Körper, Harmonie und Chaos, Wissenschaft und Esoterik. - 1991. - 44 S.
ISBN 3-8142-1041-7 DM 6,00
- Nr. 42 Busch, Friedrich W.: Umbrüche in Osteuropa und der DDR. - Konsequenzen für die Bildungsforschung. - 1990. - 37 S.
ISBN 3-8142-1042-5 DM 6,00
- Nr. 43 Jaros, Peter P./Willig, Axel: Milzpeptide. - Regulatoren des Wachstums und des Zellstoffwechsels. - 1991. - 132 S.
ISBN 3-8142-1043-3 DM 8,00
- Nr. 44 Friedenthal-Haase, Martha: Krise und Bewährung. - Martin Buber zu Grundlagen der Bildung im Erwachsenenalter. - 1991. - 53 S.
ISBN 3-8142-1044-1 DM 6,00
- Nr. 45 Golka, Friedemann W.: Die biblische Josefsgeschichte u. Thomas Manns Roman. - 1991. - 28 S.
ISBN 3-8142-1045-X DM 6,00