

Wirkung von Glia-Maturationsfaktor (GMF) und Adhäsionsfaktor (ADF) auf Kulturen leukämischer Zellen

Effect of Glia Maturation Factor (GMF) and Adhesion Factor (ADF) on Cultures of Leukaemic Cells

E. Busse

Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Zentrum der Kinderheilkunde, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, 6000 Frankfurt am Main, BRD

Z. Naturforsch. **42b**, 1481–1486 (1987); eingegangen am 30. April 1987

Glia Maturation Factor, Adhesion Factor, Leukaemic Cells

GMF was isolated from the glia of different brain parts of calf. Its influence on the input of $^3\text{H-TdR}$ was tested in leukaemic and non-malignant lymphocytes. GMF isolated from the diencephalon proved to be the most effective one. The used substance of reference was DBcAMP. The cAMP contents of leukaemic cells were lower than those of non-malignant cells, whereas the level of cGMP was higher in the first ones. We found both in non-malignant cultures and in cultures of leukaemic cells that the impact of GMF and AdF elevated the cAMP value and reduced cGMP. The adhesion of cAMP to the nuclei of leukaemic was reduced in comparison with non-malignant cells. The nuclei of leukaemic cells showed increased adhesive capacity after pre-incubation with GMF and AdF. The adhesive capacity of non-malignant nuclei remained unchanged. The adenylcyclase activity (AC) was diminished in leukaemic cells. It could not be stimulated by means of catecholamines. GMF and AdF produced a slight increase of the basal Ac activity in cultures of leukaemic cells only. But isoproterenol led to a distinct increase of the Ac activity in leukaemic cells when incubation with those two factors preceded it.

1. Einleitung

Lim und Mitarbeiter beschrieben ein aus Schweinehirn isoliertes saures Protein, das die morphologische und funktionelle Differenzierung von Glioblastomen *in vitro* induziert: den Glia-Maturationsfaktor (GMF) [1–3]. Die gleiche Arbeitsgruppe wies auch eine mitogene Aktivität des GMF nach. Er gehört somit zu den Wachstumsfaktoren. Als Maß für die induzierte Zellproliferation wendeten die Autoren den $^3\text{H-TdR}$ -Einbau und den cGMP-Spiegel, und für den Differenzierungsgrad den Gehalt der Zellen an cAMP. Nach Goldberg besteht zwischen cAMP und cGMP ein Antagonismus [4]. *In vivo* und *in vitro* zeigen maligne Zellen eine Konzentrationsveränderung der beiden Nucleotide, was die Möglichkeit nahe legt, die Bestimmung dieser Nucleotide als Indikator für eine Entdifferenzierung von Zellen heranzuziehen [5–7]. Nach der Inkubation, sowohl

von nicht malignen, als auch von Tumorzellen mit GMF, läßt sich für wenige Stunden ein Anstieg des cGMP-Spiegels nachweisen, dem ein über mehrere Tage anhaltende Erhöhung des cAMP-Wertes folgt [8]. Mit dem Anstieg des cAMP-Spiegels in den Zellen war eine Erhöhung des Gehalts an Adhäsionsfaktors (AdF) beobachtet worden [9–15]. Ali und Mitarbeiter interpretieren den cAMP-Anstieg als Ausdruck für die Aktivierung eines cAMP-abhängigen Kinase-Systems, das die Phosphorylierung von Enzymen des RNA-Systems steuert [16]. AdF greift in Phosphorylierungsprozesse der Kernproteine ein. Es werden Histon- und Nonhistonkinasen des Kerns, die für die DNA-Synthese von Bedeutung sein sollen, phosphoryliert [17]. Im folgenden sind Untersuchungen zur Veränderung cyclischer Nucleotide in nicht malignen und leukämischen Zellen nach Inkubation mit GMF und AdF wiedergegeben.

Abkürzungen: cAMP = Cyclisches Adenosin 3':5' monophosphat; cGMP = Cyclisches Guanosin 3':5' monophosphat; DBcAMP = Dibutyryl cAMP; DBcGMP = Dibutyryl cGMP; GMF = Glia-Maturations-Faktor; AdF = Adhäsions-Faktor; ALL = Akute lymphatische Leukämie; $^3\text{H-TdR}$ = Tritium markiertes Thymidin; BNH = Baby-Hamsternieren; Ac = Adenylcyclase.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0932-0776/87/1100-1481/\$ 01.00/0

2. Material und Methoden

Chemikalien

cAMP, cGMP und Eichproteine für Molekulargewichtsbestimmung (Boehringer), DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G 100 (Serva), MEM und Fetales Kälberserum (FCS) (Seromed), Phenylmethylsulfonylfluorid und Na-Dodecylsulfat (Sigma), Tris

(Merck), ^3H -Thymidin (spezif. Aktiv. 90–110 Ci/mmol) (Rossendorf-Kerntechnik).

Leukämische Zellen: Zell-Linie K 523.

Präparation und Aufreinigung von GMF

GMF wurde aus Cerebellum, Cortex und Hypothalamus (je 500 g) von 3–5 Monate alten männlichen Kälbern isoliert. Die Präparation erfolgte nach Kato und Mitarbeiter bei 4 °C [8]. Nach dem Homogenisieren des Gewebes (Messerhomogenisator Typ 302) in 0,02 M Tris-HCl-Puffer (Verhältnis 1:2 Gewebe-Puffer) und Zentrifugation (Spinco 23000×g 16 Std.). Das Lyophilisat wurde im oben genannten Puffer aufgenommen. Der Proteingehalt lag bei 4,5 mg/ml, nach Reinigung über DEAE-Sephadex A-50 (Säule 5×40 cm) bei 0,7 mg/ml. Dieses Präparat wurde durch Messung des ^3H -TdR-Einbaus auf seine biologische Aktivität getestet (*in vitro* 20-Std.-Wert Gliakultur und Lymphozyten). Die Lymphozyten wurden aus der Milz 2 Monate alter Mäuse angezüchtet.

Vitalitäts-Testung: Nach Anfärben mit Coomassie blue über 90% vital. Als Kulturmedium für die Lymphozyten diente RPMI mit 10% FCS. Die Gliakulturen wurden aus Hamsterhirn in Kulturmedium Eagle (MEM) mit 10% FCS kultiviert.

Präparation und Aufreinigung des AdF

Entsprechend der Methode von Klebe wurde AdF aus Baby-Hamsternieren (BNH) präpariert – männlich: 2–4 Wochen alt [18] dargestellt. Die BNH-Zellen wurden in RPMI-Medium mit Zusatz von FCS, Glutaminsäure und Vitaminen in Kulturflaschen suspendiert. Nach Abschalten der adherenten Zellen wurde diese bei 1000×g für 2 min zentrifugiert und in Adhäsionsmedium (150 nM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 6 mM NaHPO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) resuspendiert. Für $1\text{--}2 \times 10^6$ Zellen wurden 3 ml Medium benötigt. Die adherenten Zellen wurden mit Ammoniumsulfat versetzt (Endkonzentration 40%) nach 1 Std. 20 min bei 10000×g zentrifugiert. Das Pellet wurde in destilliertes Wasser aufgenommen, bei 160000×g für 60 min zentrifugiert, der Überstand über Sephadex G-100 (Säulenfüllung 1,5×70 cm) gereinigt [19]. Mit einem Proteingehalt von 0,9 mg/ml wurde der AdF grob gereinigt in den Versuch eingesetzt. Die AdF-Aktivität wurde anhand des Markerenzym, Transglutaminase im colorimetrischen Test geprüft [20].

Präparation der Zellkerne

Zur Bestimmung der Bindung des cAMP an die Zellkernproteine erfolgte die Präparation der Zell-

kerne nach der Methode von Medzaros und Mitarbeiter [21]. 10^9 Lymphozyten wurden in 10 ml hypotoner Salzlösung suspendiert, 0,04 M KCl, 0,02 M MgCl_2 , 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,002 M Phenylmethylsulfonylfluorid. Die Suspension wurde 15 min bei 1700×g zentrifugiert. Das Pellet wurde im MEM mit Zusatz von 0,2 M EDTA und 0,002 M Phenylmethylsulfonylfluorid aufgenommen.

Molekulargewichtsbestimmung von GMF und AdF

Die MG-Bestimmung erfolgte mittels Eichproteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [22]. Es wurden 30 μl mit einem Proteingehalt von 20 μg Protein aufgetragen, 18 Std. Laufzeit in 10% FCS, Anfärben der Banden erfolgte mittels Coomassie blue. Das Protein wurde aus dem Gel in 1 ml PBS für 2 Tage eluiert. Die Testung der biologischen Aktivität erfolgte durch Messung des ^3H -TdR-Einbaus.

Bestimmung der cyclischen Nucleotide und der Ac

Die cAMP-Konzentration wurde nach der Methode von Gilman [23] und die cGMP-Konzentration nach Kuo und Mitarbeiter gemessen [24], die Bindung der cyclischen Nucleotide an den Kern nach Prasad und Mitarbeiter [25]. Nach der Methode von Ramachandra [26] wurde die Adenylcyclase bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry [27].

3. Ergebnisse

Säulenchromatographische Aufreinigung von GMF und AdF

GMF wurde über eine DEAE-Sephadex-A-50-Säule (5×45 cm) mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,05–0,7 M) eluiert (Abb. 1). Die Testung der Fraktion erfolgte über den Nachweis der mitotischen Aktivität (Einbau von ^3H -TdR). Der Faktor wurde im peak II eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert.

Reinigung von GMF und AdF

In Tab. I sind die Reinigung von GMF und AdF wiedergegeben. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, ist die spezifische Aktivität des GMF auf das 51-fache und für AdF auf das 24-fache durch die angegebenen Reinigungsschritte angestiegen.

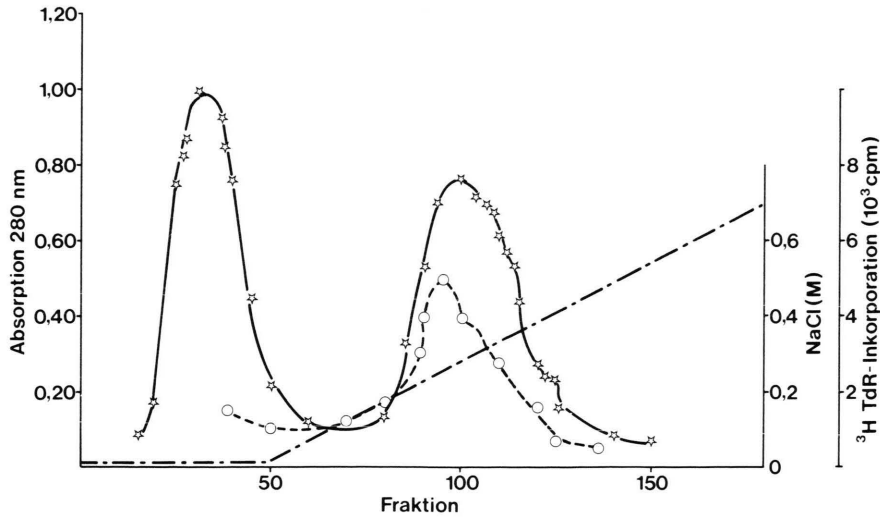


Abb. 1. Elutionsprofil von GMF über Sephadex A-50 Säule (5×45 cm) eluiert mit einem linearen Gradienten 0,05–0,7 M NaCl, mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/h, Fraktionen zu 6 ml.
 ☆---☆ Absorption des eluierten Proteins;
 ○---○ ³H-TdR-Einbau als Parameter für den Faktor, Inkubationszeit 20 h.

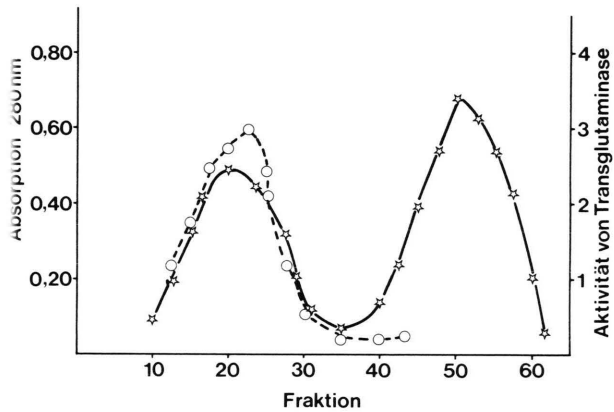


Abb. 2. Elutionsprofil von AdF über Sephadex G-100 Säule (1,5×70) eluiert mit 0,02 M tris-HCl-Puffer pH 7,4, enthält 0,05 M NaCl, mit einer Geschwindigkeit von 50 ml/Std., Fraktionen zu 6 ml.
 ☆---☆ Absorption des eluierten Proteins;
 ○---○ Transglutaminase-Aktivität.

Tab. I. Reinigung von GMF und AdF. GMF-bezogen auf je 500 g Hirngewebe, AdF-bezogen auf 10×10⁶-Zellen. Definition der Einheiten: 1 E GMF = Mitotische Aktivität in der grob gereinigten Fraktion/mg Protein. 1 E AdF = Transglutaminase-Aktivität in der grob gereinigten Fraktion/mg Protein. n = 7.

	Proteingehalt (mg)	Mitotische Aktivität		Aktivität der Transglutaminase	
		Gesamtaktivität (Einheiten)	Spez. Aktivität (E/mg)	Gesamtaktivität (Einheiten)	Spez. Aktivität (E/mg)
1. GMF					
Grob gereinigte Fraktion	8841,0	8841	1	–	–
DEAE-Sephadex A-50	43,6	2460	51	–	–
2. AdF					
Grob gereinigte Fraktion	263,0	–	–	263,0	1
Sephadex G-100	12,0	–	–	102,0	24

Die Abb. 3 (HPLC für HF) entspricht der große peak dem HF

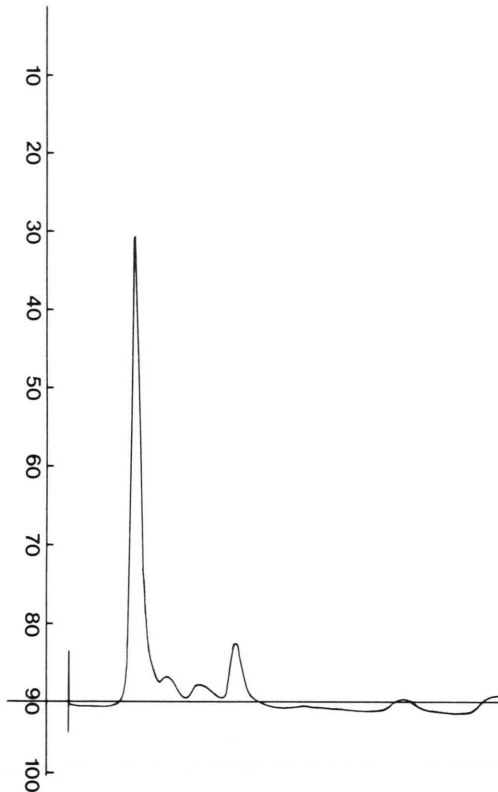


Abb. 3. HPLC von HF (Hypothalamus-Protein). Herstellung erfolgte aus dem Hypothalamus des Schweins. Säule Octadecyl-Si 300 Polyo/3 Absorption 210 nm. Laufmittel Sörens-Puffer pH 7,0, Flow 0,4 ml/min, Chart 5 mm/min.

^3H -TdR-Einbau nach Vorinkubation mit DBcAMP, GMF und AdF kaum beeinflusst, während nach Einwirken dieser Faktoren in Kulturen leukämischer Zellen ein deutlicher Abfall des ^3H -TdR-Einbaus

nachweisbar war. Nach Inkubation mit DBcGMP wurde eine wesentliche Aktivierung des ^3H -TdR-Einbaus in Kulturen leukämischer Zellen beobachtet.

Bindung von cAMP an den Zellkern bei nicht malignen Zellen und leukämischen Zellen

Die Bindungskapazität von cAMP an den Zellkern nicht maligner Zellen war dreimal so hoch wie von Zellkernen leukämischer Zellen (Tab. IV). Wie der Tabelle weiter zu entnehmen ist, war die Bindung an nicht maligne Zellkerne durch DBcAMP, GMF und AdF nicht beeinflusst, während Kerne kultivierter leukämischer Zellen eine erhöhte Bindung aufwiesen. Durch DBcGMP ändert sich die Bindungskapazität bei nicht malignen Zellen. Sie sank auf Werte von leukämischen Zellen ab.

Ac-Aktivität in Kulturen nicht maligner und leukämischer Zellen

Die basale Ac-Aktivität in Kulturen nicht maligner Zellen ist um das Dreifache höher, als in Kulturen maligner Zellen (Tab. IV). Isoproterenol erhöht in nicht malignen Zellen die cAMP-Bindung, während die Ac-Aktivität in leukämischen Zellen nicht verändert wurde. Nach Einwirken von GMF und AdF war in nicht malignen Zellen keine Beeinflussung der Basalaktivität der Ac, sowie der mittels Isoproterenol erhöhten cAMP-Bindung zu beobachten. Desgleichen wurde die Basalaktivität der Ac in Kulturen leukämischer Zellen nach Vorinkubation mit GMF und AdF nicht verändert. Hingegen erfolgte in den Kulturen leukämischer Zellen nach Einwirken von GMF und AdF unter Isoproterenol ein Anstieg des cAMP-Gehaltes und erreichte Werte, wie sie bei normalen Zellen gemessen wurden.

Tab. II. Einbau von ^3H -TdR und Veränderung des cAMP-Spiegels nach Einwirken von GMF, isoliert aus verschiedenen Hirnteilen, auf Glia-Zellkulturen getestet angezüchtet, aus Hamsterhirn im Medium Eagle (MEM) +10% FCS auf Lymphozyten getestet: angezüchtet aus Lymphozyten von AKR-Mäusen im Medium Eagle (MEM) +10% FCS. Inkubationszeit: 20 h. $n = 7$, $p^* < 0,01$ signifikant zur Kontrolle.

Faktor	Zahl der Untersuchungen (n)	Glia ^3H -TdR-Einbau (%)	Zellkulturen cAMP p mole/mg Protein	Lymphozyten ^3H -TdR-Einbau	Lymphozyten cAMP p mole/mg Protein
Kontrolle	10	100	20 ± 4	100	1,4 ± 0,8
Modulla oblangata	6	190* ± 65	46* ± 10	109 ± 10	3,0 ± 0,9
Hypothalamus	8	210* ± 50	59* ± 16	120 ± 12	4,2 ± 0,6
Cerebellum	4	165* ± 30	36* ± 8	90 ± 15	1,9 ± 0,5
Cortex	6	195* ± 45	45* ± 12	96 ± 20	3,6 ± 0,7

Tab. III. Einbau von ^3H -TdR-Einbau und Veränderungen des Gehalts der cyclischen Nucleotide in den Zellkulturen maligner Zellen nach Einwirken von GMF, $p^* < 0,01$ signifikant zur Kontrolle.

Vorbehandlung der Kulturen	Zahl der Untersuchungen (n)	nicht maligne Zellen		Q_{cGMP}^{cAMP}	leukämische Zellen		Q_{cGMP}^{cAMP}	^3H -TdR-Einbau (%)
		cAMP p mole/ 10^6 -Zellen	cGMP		cAMP p mole/ 10^6 -Zellen	cGMP		
Kontrolle	10	1,40 \pm 0,20	0,10 \pm 0,02	14	0,7 \pm 0,3	0,19 \pm 0,04	4	100
GMF	4	3,40* \pm 0,40	0,06* \pm 0,01	57	1,3* \pm 0,2	0,10* \pm 0,03	13	87 \pm 15
AdF	7	3,30* \pm 0,50	0,05* \pm 0,01	66	1,2* \pm 0,2	0,11* \pm 0,03	11	89 \pm 9
GBcAMP	9	2,70* \pm 0,40	0,05* \pm 0,01	54	1,5* \pm 0,3	0,10 \pm 0,05	15	83 \pm 10
DBcGMP	8	0,85 \pm 0,20	0,17 \pm 0,03	5	0,5 \pm 0,1	0,26 \pm 0,03	2	190 \pm 12

Tab. IV. Bindung von cAMP an Kernproteine nicht maligner und leukämischer Zellen aus Kulturen unter Einfluß von GMF und AdF, Zellkulturen mit Substanzen sowie mit Faktoren 30 h vorinkubiert.

Vorbehandlung der Kultur	Bindung von cAMP am Kernprotein	
	nicht maligner	leukämischer Zellen
Kontrolle	1900 \pm 285	700 \pm 150
GMF	1900 \pm 210	1700 \pm 180
AdF	1600 \pm 190	1300 \pm 150
DBcAMP	2200 \pm 200	2100 \pm 205
DBcGMP	800 \pm 130	670 \pm 120

4. Diskussion

Proteine aus dem Zentralnervensystem, die die Proliferation beeinflussen, sind seit ihrer Entdeckung durch Lim und Kato [1, 2, 8] häufig untersucht worden [3]. Von den meisten Proteinen, so auch von dem von uns eingesetzten Wachstumsfaktor, ist die chemische Struktur nicht bekannt. Es handelt sich um niedermolekulare Proteine. Eine weitere Cha-

rakterisierung des GMF gelang uns, indem wir nachwiesen, daß der aus dem Hypothalamus isolierte GMF vermutlich außer Glia auch Lymphozyten beeinflusst. Somit ist eine Identität mit Faktoren aus diesem Hirngebiet möglich, die von verschiedenen Autoren [29, 32] als Regulatoren, u. a. für Lymphozyten, beschrieben werden.

Da sich der Gehalt an cyclischen Nucleotiden in transformierten Zellen charakteristisch verändert – Abnahme des cAMP-Gehalts begleitet von einem Anstieg des cGMP-Spiegels – bestimmten wir den cAMP- und cGMP-Gehalt in Kulturen nicht maligner und leukämischer Zellen unter Einwirken von GMF und AdF. Die Befunde sprechen für eine durch GMF und AdF ausgelöste funktionelle Differenzierung.

Wie aus Tab. II zu entnehmen ist, stieg der cAMP/cGMP-Quotient in Zellen leukämischer Kulturen unter DBcAMP, GMF und AdF an. Die Veränderungen der Nucleotide nach Gabe von DBcAMP entsprachen den Befunden der Literatur [33–39]. Unter der Einwirkung von GMF und AdF wurde die

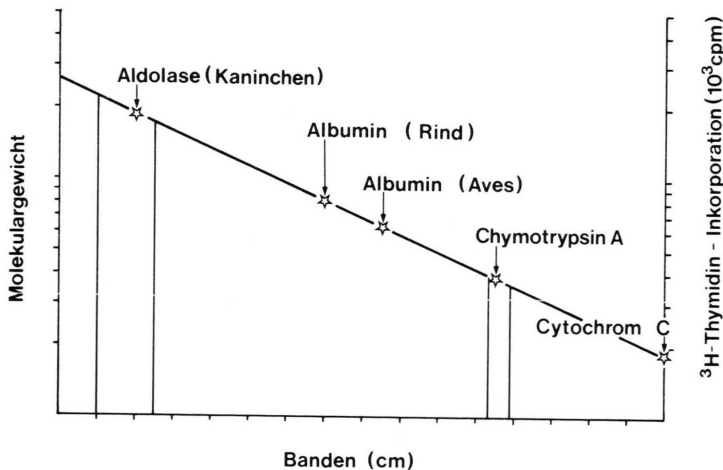


Abb. 4. Darstellung der Molekulargewichte für GMF und AdF.

Tab. V. Veränderungen der Ac-Aktivität nach Einwirken von GMF und AdF in Zellkulturen nicht maligner und leukämischer Zellen, Zellkulturen mit Faktoren 90 h vorinkubiert. Isop. = Isoproterenol 10^{-4} M eingesetzt.

Vorbehandlung der Kultur	AC-Aktivität nicht maligne Zellen (p mole cAMP/10 ⁷ -Zellen/10min)		Steigerung (%)	leukämische Zellen (p mole cAMP/10 ⁷ -Zellen/min)		Steigerung (%)
	Kontrolle	+Isop. 10^{-4} M		Kontrolle	+Isop. 10^{-4} M	
Kontrolle	1,9±0,3	4,1*±0,4	200–215	0,7±0,3	0,8±0,2	0
GMF	1,4±0,3	3,4*±0,3	200–240	1,1±0,3	2,5±0,5	180–230
AdF	1,4±0,4	4,4*±0,7	190–230	1,3±0,6	3,0±0,5	200–250

* Signifikant zum jeweiligen Wert ohne Isop. (*p<0,05).

cAMP-Bindungs Kapazität der Zellkernproteine von Kulturen leukämischer Zellen so erhöht, daß Werte wie bei normalen Zellen erreicht wurden. Verschiedene Autoren [7, 34] halten die verminderte Bindungsfähigkeit der Kernproteine für einen Hinweis dafür, daß die Zellen entdifferenziert sind. Die Ac-Aktivität nicht maligner Zellen wurde weder durch GMF, noch AdF aktiviert, während die Ac der Kul-

tur leukämischer Zellen nach Vorinkubation mit GMF und AdF sowohl eine Erhöhung der Basalaktivität, als auch eine Stimulierung unter Isoproterenol. Wir folgern daraus, daß weder GMF, noch AdF, die nicht malignen Zellen in der Ruhepause beeinflussen, wogegen bei malignen Zellen unter Umständen infolge der vermehrten Mitosen der GMF und AdF eine Funktion haben.

- [1] R. Lim und K. Mitsunobu, *Science* **185**, 63 (1974).
 [2] R. Lim, S. Nakagawa, B. G. Arnason und D. E. Turriff, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **195**, 4373 (1981).
 [3] J. P. Brockes und C. R. Kinter, *Cell* **45**, 301 (1986).
 [4] J. P. Goldberg, M. K. Haddox, R. Estenseni, J. G. White, C. Lopez und J. W. Hadden, in W. Brown (ed.): *Cyclic AMP, Growth and Immunology Response*, pp. 247–264, Academic Press, New York (1974).
 [5] U. Carpentieri, J. J. Minquell und F. H. Gardner, *Pediatr. Res.* **15**, 575 (1981).
 [6] L. Elias und F. J. Wogenrich, *Leukemia Res.* **4**, 161 (1980).
 [7] J. W. Hadden, E. M. Hadden, M. K. Haddox und N. D. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3024 (1973).
 [8] T. Kato, T. L. Chiu, R. Lim, S. S. Troy und D. E. Turriff, *Biochem. Biophys. Acta* **579**, 216 (1979).
 [9] J. Gerfaux, S. Rausset, F. Chany-Fournier und C. Chany, *Cancer Res.* **41**, 3629 (1981).
 [10] E. A. Jaffe und D. F. Mosher, *J. Exp. Med.* **147**, 1779 (1978).
 [11] J. Otten, G. S. Johnson und I. H. Pastan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1192 (1971).
 [12] T. Salor, L. A. Liotta und K. Trygwyason, *J. Biol. Chem.* **258**, 3958 (1983).
 [13] A. Girard und J. Gabrian, *J. Exp. Cell. Res.* **133**, 93 (1971).
 [14] R. E. Weiss und A. H. Reddi, *J. Exp. Cell. Res.* **133**, 247 (1971).
 [15] K. M. Yamada, *Nature* **275**, 179 (1978).
 [16] U. Ali, S. Rasheed und T. Hunter, *RNA Tumor Virus (in Habor May 20–24)*, 249 p., Cold. Spring, New York (1981).
 [17] T. A. Langan, *Proteinkinase and Proteinkinase Subsets*, pp. 99, Raven Press, New York (1973).
 [18] R. J. Klebe, *Nature* **250**, 248 (1974).
 [19] M. Vuento, M. Wram und E. Rusolatki, *Febs Letters* **82**, 227 (1977).
 [20] H. Wallsch und M. J. Myak, in W. B. Jakoby (ed.): *Methods in Enzymology*, Vol. V, pp. 833–834, Academic Press, New York (1962).
 [21] G. T. Meszaros, T. Rombaynyi, F. Antoni und A. Farago, *Febs Letters* **134**, 139 (1981).
 [22] U. K. Laemmler, *Nature* **227**, 680 (1970).
 [23] A. G. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 305 (1970).
 [24] J. F. Kuo, W. N. Kuo, M. Shoji, W. Devis, V. und L. Donnelly, *J. Biol. Chem.* **251**, 1759 (1976).
 [25] N. K. Prasad, R. Rosenberg, F. Baskin, D. Sparkman, C. Ulrich und B. Wischmeyer, *Cancer Res.* **40**, 2884 (1980).
 [26] J. Ramachandra, *Anal. Biochem.* **43**, 227 (1971).
 [27] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. L. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 [28] R. A. Murphy, A. Y. Watson und J. A. Rhodes, *Appl. Neurophysiol.* **47**, 33 (1984).
 [29] A. Circolo, R. Biachi, B. Nardelli, P. Rivose und E. Bonasser, *J. Immunol.* **128**, 556 (1982).
 [30] R. J. Cross, W. H. Markesbery, T. Brooks und L. Rossman, *Brain Res.* **196**, 79 (1980).
 [31] S. E. Keller, M. S. Stein, S. Camerino und S. J. Schleifer, *Cell Immunol.* **52**, 334 (1982).
 [32] M. Stein, R. Schiawi und M. Canerino, *Science* **191**, 435 (1976).
 [33] Y. S. Cho-Chung, *Cancer Res.* **34**, 3492 (1974).
 [34] Y. S. Cho-Chung, *Cell. Mol. Biol.* **26**, 395 (1980).
 [35] J. R. Sheppard, *Nature* **236**, 14 (1972).
 [36] N. Kröger, I. Florentin, G. Lorans und G. Mathe, *Immunol.* **33**, 439 (1977).
 [37] S. R. Whittemore, T. Ebendal, L. Larkors, L. Olson und A. Seiger, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**, 817 (1986).
 [38] D. Wion, P. Barrand, E. Dixon, J. Scott und P. Brachet, *Febs Letters* **189**, 37 (1985).
 [39] A. S. Yonstin, E. Leof, G. D. Shipley und H. L. Moses, *Cancer Res.* **46**, 1015 (1986).