

RAZINA KALMODULINA I PROMJENE FIZIOLOŠKOG STATUSA STANICE

N. Raos i R. Rozgaj

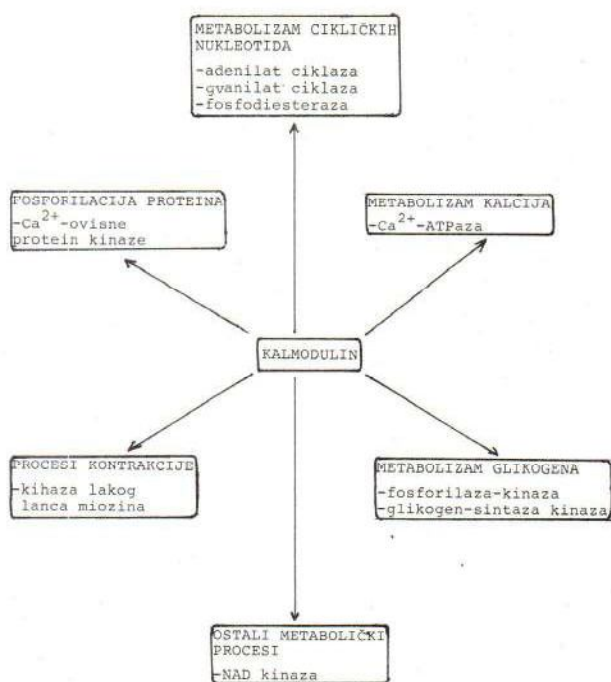
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno 30. IV. 1991.

Kalmodulin je modulatorski protein ovisan o kalciju, koji regulira tridesetak enzimskih sustava. Do poremećaja njegove razine u stanici, a i do njegove preraspodjele između citosolne i membranske frakcije dolazi pod utjecajem kemijskih (ioni metala) i bioloških činilaca (hormoni, virusi). Te su pojave osobito izražene pri malignoj transformaciji stanice. Zasebno su obrađena oba razreda činilaca, a ovaj pregled ukratko opisuje i najvažnije analitičke postupke za određivanje razine kalmodulina u homogenatima tkiva i stanica. Detaljni mehanizam djelovanja kemijskih i bioloških činilaca na razinu kalmodulina još nije poznat.

Ključne riječi: biosinteza kalmodulina, intracelularni procesi, kalcij, maligna transformacija, modulatorski protein, regulacija razine kalcija, stanični metabolizam.

Kalmodulin je nesumnjivo najvažniji predstavnik porodice proteina ovisnih o kalciju, koji reguliraju stanične funkcije. Kako na njegovu aktivnost ne utječe samo kalcij, nego i drugi agensi (u prvom redu ioni teških metala), istraživanje kalmodulina doprinosi novim spoznajama o mehanizmu toksičnog djelovanja metala, ali i drugih, anorganskih i organskih tvari. Taj regulacijski protein otkriven je sredinom šezdesetih godina kao aktivator fosfodiesteraze cikličkih nukleotida (1), no ubrzo se pokazuje da je to samo jedna od mnoštva njegovih bioloških funkcija. Kalmodulin ne samo da utječe na razgradnju cikličkih nukleotida aktivacijom fosfodiesteraze 3',5'-cikličkih nukleotida (PDE) nego i na njihovu sintezu, djelujući na adenilat ciklazu (2, 3). Osim što na taj način regulira razinu cikličkih nukleotida u stanici (a time, naravno, i o njima ovisan stanični metabolizam), kalmodulin aktivira i o kalciju ovisnu ATP-azu, »pumpu za kalcij« (4, 5), sudjelujući tako u regulaciji razine kalcija u stanici. No to su samo najvažnije funkcije tog nadasve važnog i zanimljivog proteina: danas je poznato više od trideset enzima i enzimskih sustava reguliranih s pomoću kalmodulina (slika 1) (6), pa *Vanaman* ne pretjeruje kada u njemu vidi protein koji »vjerojatno regulira sve u stanici, počev od diobe pa do kretanja i izlučivanja« (7). Sve su te funkcije usko povezane s

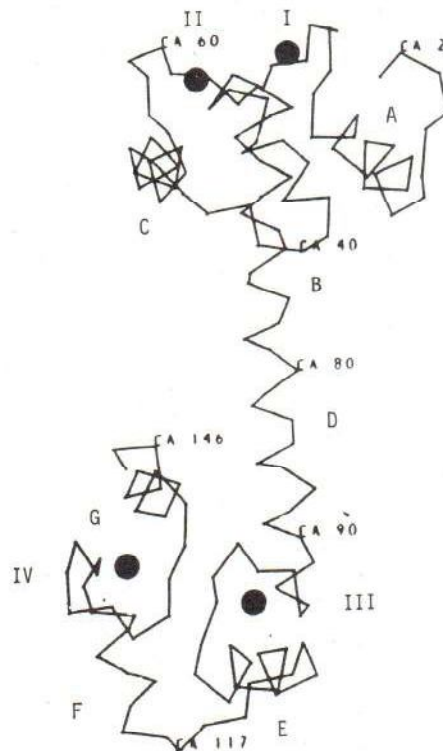


Slika 1. Osnovna fiziološka djelovanja kalmodulina. Za detalje vidi ref. 6.

vezanjem kalcija, pa se kalmodulin može smatrati ključem za razumijevanje djelovanja kalcija na stanični metabolizam.

Po kemijskoj strukturi kalmodulin je malen (148 aminokiselinskih ostataka, $M_r = 17000$), izrazito kiseo protein ($pH_1 = 3,9 - 4,3$) sastavljen od samo jednog polipeptidnog lanca. Zbog nedostatka cisteinskih ostataka i predominacije alfa-uzvojnica u strukturi izuzetno je otporan na denaturaciju: zadržava aktivnost i nakon nekoliko minuta kuhanja (8), pa se ta osobina kalmodulina iskorištava i pri njegovoj izolaciji (9). Primarna struktura proteina dobro je očuvana tijekom evolucije (10), pa se strukture kalmodulina izoliranih iz divergentnih biljnih i životinjskih vrsta vrlo malo razlikuju (8). Štoviše, kalmodulin izoliran iz jedne vrste može aktivirati PDE iz neke druge vrste bez izrazitije razlike u aktivnosti (8). Te dvije činjenice valja imati na umu i pri njegovu analitičkom određivanju.

Aktivnost kalmodulina usko je povezana s vezanjem kalcija, a često i drugih metala (11). Unatoč mnogobrojnim nesuglasicama, danas se s dosta sigurnosti može reći da kalmodulin veže četiri kalcijeva iona (slika 2), i to na dva mjesta niskog afiniteta ($K_a = 5 \times 10^6 \text{ Lmol}^{-1}$; petlje III i IV) i dva mjesta visokog afiniteta ($K_a = 5 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}$, petlje I i II) (12). Drugi ioni također se vežu za kalmodulin (11), bilo za četiri glavna («kalcijiska») ili pak za šest alosteričkih («sporednih») mjesta na molekuli (13). Važno je



Slika 2. Rendgenska struktura kompleksa kalmodulina s kalcijem, CaM. Ca₄: molekula se sastoji od sedam alfa-uzvojnica (A do G) i četiri petlje za vezanje kalcija (I do IV). Slika je preuzeta iz ref. 39, uz manje modifikacije.

pritom napomenuti da se neki metali (Ca²⁺, Sr²⁺) vežu samo za glavna, drugi (Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Al³⁺) samo za sporedna, dok se treći (La³⁺, Tb³⁺, Pb²⁺, Cd²⁺) mogu vezati i za jedna i za druga mjesta (13).

Glavna tema ovog članka bit će povezanost fizioloških i patoloških stanja s razinom kalmodulina u stanici. Može se, naime, pretpostaviti da se na intracelularne procese regulirane kalmodulinom može djelovati dvojako: ili izravnim utjecajem na aktivnost kalmodulina ili pak poremetnjom njegove razine ili preraspodjele unutar stanice. Bez obzira na to što je tumačenje ovog drugog mehanizma znatno otežano zbog mnoštva fizioloških funkcija kalmodulina, određivanje razine tog proteina može u najmanju ruku biti dobar pokazatelj fiziološkog stanja stanice. To osobito vrijedi u slučaju porasta razine kalmodulina pri malignoj transformaciji stanica.

Čitatelja koji se više zanima za taj nadasve važan modulatorski protein upućujemo na nekoliko odabranih članaka (6, 7, 11, 14, 15).

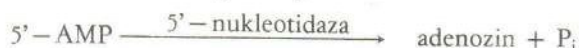
ANALITIČKI POSTUPCI

Za mjerenje razine kalmodulina u homogenatu stanica ili tkiva razvijena su tri, danas već standardna postupka (ovdje valja napomenuti da postoje već gotovi setovi za sve tri metode). To su: elektroforeza na poliakrilamidnom gelu, enzimska i radioimunološka metoda. Zbog vrlo niske razine kalmodulina u tkivu (oko 50 mg/kg; 0,3 – 5% ukupnog proteina) uobičajeno bojenje poliakrilamidnih ploča (Coomassie blue) nije dovoljno osjetljivo, pa je nužno provesti razvijanje ploča srebrnim solima (silver stain) čime se postiže oko stotinu puta veća osjetljivost (16). Po mogućnosti detekcije kalmodulin se bitno ne izdvaja od drugih proteina (0,25 ng/mm²; drugi proteini 0,05 – 0,1 ng/mm² (16). Iako se tom metodom mogu dobiti vrlo dobre i reproducibilne vrijednosti za razinu kalmodulina u stanici (linearni odziv u rasponu od 1 do 100 ng proteina nanesenog na gel (17), valja napomenuti da je bojenje srebrnim solima dosta osjetljiv postupak, a metoda je usto i dugotrajna.

Druga metoda za analitičko određivanje kalmodulina u homogenatu osniva se na stimulaciji fosfodiesteraze cikličkih nukleotida pri reakciji hidrolitičkog cijepanja cikličkog adenzin-monofosfata. Pri analizi tom metodom (18) koriste se dvije uzastopne enzimске reakcije. Prva je cijepanje cikličkog adenzin-3',5'-monofosfata (cAMP):



a druga je hidroliza 5'-AMP do anorganskog fosfata:



Fosfati se, kao konačni produkti reakcije, određuju nekom standardnom, obično spektrofotometrijskom metodom. Unatoč dosta velikoj osjetljivosti (oko 20 ng) i kratkom vremenu potrebnom za analizu, nedostatak je metode da mjeri samo biološki aktivan kalmodulin (nešto se kalmodulina, naime, denaturira pri preparaciji ekstrakta koja uključuje grijanje uzorka). Na točnost metode utječu i komponente uzorka kao što su npr. proteolitički enzimi i endogena fosfodiesteraza.

Treća metoda (19) temelji se na imunološkoj reakciji kalmodulina s odgovarajućim antitijelom koja se prati mjerenjem razrjeđenja kalmodulina obilježenog jodnim izotopom ¹²⁵I (radioimunološki test, RIA). Metoda je vrlo osjetljiva (granica detekcije 15 pg), reproducibilna (3 – 5%) i vrlo jednostavna za primjenu. Poteškoće se ipak mogu očekivati zbog loše kvalitete antitijela (križanje s kalmodulinom iz druge vrste i drugim proteinima, posebice onima koji vežu kalcij).

KALMODULIN I MALIGNA TRANSFORMACIJA

Prva veza između kalmodulina i maligne transformacije uočena je 1976. godine kada je otkriveno da u fibroblastima pilećeg embrija transformiranim virusima dolazi do četverostrukog porasta topljivog kalmodulina prema ukupnim proteinima (20). Mnogo se više saznalo o toj pojavi istraživanjem normalnog i tumorskog tkiva jetre (21 – 25). U

normalnoj jetri izmjerena je koncentracija kalmodulina od oko 0,22 do 0,59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteina (22) i 40–78 $\mu\text{g}/\text{g}$ tkiva (23). U tumorskom tkivu jetre izmjerena je, međutim, i do šest puta veća koncentracija kalmodulina (24, 25), mjerena prema masi tkiva i 2–3 puta veća koncentracija prema ukupnim proteinima (21, 22). Brzina rasta tumora pokazala se važnom za koncentraciju kalmodulina: brzorastući tumori imaju višu razinu kalmodulina od tumora koji rastu sporo (22–26).

Dosta radova napravljeno je i na drugim tkivima, ponajviše na fibroblastima iz pilećeg zametka (20, 27–30), no i na bubrezima štakora (31, 32), limfocitima (33), a i na staničnim linijama – mišjim (3T3 (32), goveđim (MDBK) i ljudskim (WISH (34). I tu se redovito zapaža povećanje razine kalmodulina pri virusnoj transformaciji – od 1,7 (27) do 4,3 puta (20). Najveći porast razine kalmodulina zabilježen je kod leukemičnih limfocita (6–10 puta prema razini u normalnim limfocitima (33, 35).

Maligna transformacija utječe i na raspodjelu kalmodulina unutar stanice (između citosola i staničnih membrana). U normalnoj jetri kalmodulin je raspoređen između topljive (citosolne) i taložne (membranske) frakcije u omjeru 2:1. U tumorskom tkivu (Morrisov hepatom) povećava se taj omjer 6–43 puta u korist citosolne frakcije (24). U drugim slučajevima ta pojava nije toliko izražena. U kulturi fibroblasta pilećeg embrija (50–90% kalmodulina u citosolu) opaženo je tek remećenje preraspodjele kalmodulina nakon maligne transformacije (27, 28), dok neka druga istraživanja pokazuju podjednak porast kalmodulina u obje frakcije (21, 22).

Razina kalmodulina povišena je i u drugim tkivima koja se ubrzano dijele. Osobito treba istaknuti psorijazu kod koje je na mjestima lezija izmjeren vrlo velik porast razine ukupnog kalmodulina: i do trideset puta prema kontrolnoj skupini (mjereno prema ukupnoj DNA (36). Novija istraživanja, međutim, pokazuju da ta pojava nije specifična samo za psorijazu, već i za druge kožne lezije (37).

DRUGI (KEMIJSKI I BIOLOŠKI) ČINIOCI

O utjecaju drugih činilaca na razinu kalmodulina u stanici zna se mnogo manje. Čini se da najjači utjecaj imaju ioni metala koji pokazuju afinitet prema kalmodulinu. Kalcij utječe na biosintezu kalmodulina (38), a također i na njegovu raspodjelu između citosola i staničnih membrana (39). Divalentni metalni ioni koji se vežu za kalmodulin (Pb^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+}), kako pokazuju mjerenja *in vitro*, uzrokuju i preko stotinu puta veće vezanje kalmodulina za moždane membrane (40). Do sličnog opažanja dolazi i jedan od autora ovog članka nalazeći da takvo djelovanje imaju i ioni Ni^{2+} (41). Nakon akutne intoksikacije nikal(II)-acetatom, koncentracija kalmodulina vezanog za membrane u bubrežnom tkivu štakora raste oko 20% u razdoblju od osam sati nakon injiciranja, da bi se nakon sedam dana vratila na normalnu vrijednost. Taj nalaz potkrepljuje i činjenica da citosolna koncentracija kalmodulina pokazuje obrnuti trend, dok ukupna koncentracija kalmodulina u stanici ostaje nepromijenjenom. Nikal je, valja napomenuti, također metal koji se veže za kalmodulin (42) i koji je, kao i gore navedeni metali, inhibitor PDE (43).

Na preraspodjelu kalmodulina utječu i drugi agensi. Metodom imunofluorescencije pronađeno je da u kori nadbubrežne žlijezde štakora dolazi do pojačana vezanja

kalmodulina za nukleus nakon supkutane injekcije kortikotropina (44) što je dovelo autore do hipoteze da kalmodulin sudjeluje u hormonskoj regulaciji nuklearnih procesa. Slično djelovanje ima i gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH), koji izaziva za 4–6% pojačano vezanje kalmodulina za plazmatske membrane pituicita (45). Suprotno djelovanje imaju estrogen i progesteron koji u miometriju kunića s odstranjenim jajnicima izazivaju porast kalmodulina u citosolu za 20–40% (46). Produžena stimulacija dopaminskih receptora također uzrokuje otpuštanje kalmodulina sa stanične membrane (47, 48).

Do porasta koncentracije kalmodulina u citosolu dolazi i prilikom regeneracije jetre između 6. i 14. sata nakon parcijalne hepatektomije (23, 49, 50). Zanimljivo je da je ta pojava popraćena i promjenom razina drugih metabolita vezanih za metabolizam kalmodulina (cAMP, protein kinaza I i II).

ZAKLJUČAK

Procesi kojima dolazi do poremetnje i preraspodjele razine kalmodulina u stanici još su daleko od toga da budu potpuno razjašnjeni. Dapače, imajući u vidu svu složenost bioloških funkcija kalmodulina i još k tome raznorodnost procesa u kojima se opažaju promjene njegove koncentracije unutar stanice, teško je i vjerovati da se sve te pojave mogu objasniti jednostavnim i jedinstvenim mehanizmom. U ovom kratkom pregledu stoga ćemo se kloniti pretjeranih generalizacija i spekulacija; čitaoca svakako upućujemo na odličnu raspravu o tom problemu (51).

Boljem razumijevanju navedenih pojava sigurno pridonose spoznaje o biosintezi kalmodulina. Iako se sintetizira s ostalim proteinima na granici G_1/S faze staničnog ciklusa (29, 52, 53), u stanicama koje se oporavljaju od deprivacije kalcija može doći i do specifične sinteze kalmodulina (32, 54). Poremećaj razine kalmodulina u transformiranim stanicama može se dovesti u vezu s poznatom činjenicom da manjak kalcija inhibira proliferaciju samo normalnih stanica, dok na transformirane stanice ne utječe (55, 56). U ranim fazama mitoze povećava se razina kalcija u stanici (57), a i sam se kalmodulin ponaša kao mitogen budući da stimulira sintezu DNA (54, 58).

Unatoč nemogućnosti postavljanja općenitog mehanizma koji bi povezivao normalna i patološka stanja s razinom kalmodulina, mogu se postaviti tri osnovne hipoteze:

1. Transformirane stanice gube sposobnost da snizuju razinu kalmodulina nakon njegove sinteze s ostalim proteinima u fazi G_1/S staničnog ciklusa. Tu hipotezu osobito potkrepljuju istraživanja *M. Veigl i suradnika* na kulturi normalnih i transformiranih stanica (30).

2. Transformacija izaziva promjene na proteinima (i drugim spojevima) koji vežu kalmodulin. To se osobito odnosi na komponente stanične membrane. (Ovim se mehanizmom može obuhvatiti i djelovanje drugih agensa, npr. iona metala).

3. Osnovni poremećaj je gubitak sposobnosti prenošenja normalnog kalcijskog signala (regulacija fluksa kalcija ili utjecaj na pojedine stupnjeve prijenosa). Kako je kalmodulin uključen u gotovo sve stanične procese ovisne o kalciju, taj će se poremećaj očitovati i u promjeni njegove razine.

Iako navedene hipoteze ne mogu detaljno razjasniti mehanizam koji dovodi do poremećaja razine kalmodulina u stanici, promjene razine kalmodulina u tkivima i stanicama mogu upozoriti na neke zajedničke korijene patoloških stanja.

LITERATURA

1. *Cheung WY*. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;38:533–8.
2. *Brostrom CO, Huang YC, Breckenridge BL, Wolff DJ*. Identification of calcium binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:64–8.
3. *Westcott KR, Laporte DC, Storm DR*. Resolution of adenylate cyclase sensitive and insensitive to Ca^{2+} and calcium-dependent regulatory protein (CDR) by CDR-Sepharose affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:204–8.
4. *Cox JA, Comte M, Stein EA*. Activation of human erythrocyte Ca^{2+} -dependent Mg^{2+} -activated ATPase by calmodulin and calcium: Quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4265–9.
5. *Gopinath RM, Vincenzi FF*. Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca^{2+} - Mg^{2+}) ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;77:1203–9.
6. *Cheung WY*. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980;207:19–27.
7. *Vanaman TC*. Structure, function and evolution of calmodulin. U: *Cheung WY*, ur. *Calcium Cell Function* New York: Academic Press, 1980;1:41–58.
8. *Cheung WY*. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Evidence for and properties of a protein activator. *J Biol Chem* 1971;246:2859–69.
9. *Dedman JR, Potter JD, Jackson RL, Johnson JD, Means AR*. Physicochemical properties of rat testis Ca^{2+} -dependent regulatory protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1977;252:8415–22.
10. *Grand RJA, Shenolikar S, Cohen P*. The amino acid sequence of the δ subunit (calmodulin) of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 1981;113:359–67.
11. *Raos N*. Binding of metal cations to calmodulin. *Period Biol* 1990;92:341–54.
12. *Wang CLA*. A note on Ca^{2+} binding to calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:426–30.
13. *Cox JA*. Interactive properties of calmodulin. *Biochem J* 1988;249:621–9.
14. *Cheung WY*. Calmodulin: an overview. *Federation Proc* 1983;41:2253–7.
15. *Watterson DM, Vincenzi FF(ur)* Calmodulin and cell functions. *Ann N Y Acad Sci* 1980;356.
16. *Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR*. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1980;105:361–3.
17. *Veigl ML, Vanaman TC, Branch ME, Sedwick W*. Differences in calmodulin levels of normal and transformed cells as determined by culture conditions. *Cancer Res* 1984;44:3184–9.
18. *Wallace RW, Tallant EA, Cheung WY*. Assay of calmodulin by Ca^{2+} -dependent phosphodiesterase. *Meth Enzymol* 1983;102:39–47.
19. *Chafouleas JG, Dedman JR, Means AR*. Radioimmunoassay of calmodulin. *Meth Enzymol* 1982;84:138–47.
20. *Watterson DM, Van Eldik LJ, Smith RE, Vanaman TC*. Calcium dependent regulatory protein of cyclic nucleotide metabolism in normal and transformed chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2711–5.

21. Nakajo S, Hayashi K, Nakaya K, Nakamura Y. A simple procedure for the purification of calmodulin bound to membranes; calmodulin bound to the particulate fraction of AH-66 hepatoma ascites cells. *J Biochem* 1983;93:149–57.
22. Wei JW, Morris HP, Hickie A. Positive correlation between calmodulin content and hepatoma growth rates. *Cancer Res* 1982;42:2571–4.
23. MacManus JP, Braceland BM, Rixon RH, Whitfield JF, Morris HP. An increase in calmodulin during growth of normal and cancerous liver *in vitro*. *FEBS Lett* 1981;133:99–102.
24. Criss WE, Kakiuchi S. Calcium: calmodulin and cancer. *Fed Proc* 1982;41:2289–91.
25. Uenichi K, Criss WE, Kakiuchi S. Calcium-activatable phosphodiesterase and calcium dependent modulator protein in transplantable hepatoma tissues. *J Biochem* 1980;87:601–7.
26. Wei JW, Hickie RA. Increased content of calmodulin in Morris hepatoma 5123 t.c.(h). *Biochem Biophys Res Commun* 1981;100:1562–8.
27. Van Eldik LJ, Burges WH. Analytical subcellular distribution of calmodulin and calmodulin binding proteins in normal and virus-transformed fibroblasts. *J Biol Chem* 1983;258:4539–47.
28. La Porte DC, Gidwitz S, Weber MJ, Storm DR. Relationship between changes in the calcium dependent regulatory protein and adenylate cyclase during viral transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;86:1169–77.
29. Veigl ML, Sedwick WD, Vanaman TC. Calmodulin and Ca^{2+} in normal and transformed cells. *Fed Proc* 1982;41:2283–8.
30. Veigl ML, Vanaman TC, Branch ME, Sedwick WD. Differences in calmodulin levels of normal and transformed cells as determined by culture conditions. *Cancer Res* 1984;44:3184–9.
31. Chafouleas JG, Pardue RL, Brinkley BR, Dedman JR, Means AR. Regulation of intracellular levels of calmodulin and tubulin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:996–1000.
32. Connor CG, Moore PB, Brady RC, Horn JP, Arlinghaus RB, Dedman JR. The role of calmodulin in cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;112:647–54.
33. Takemoto D, Jilka C. Increased content of calmodulin in human leukemia cells. *Leukemia Res* 1983;7:97–100.
34. Bourgeade MF, Besancon F, Thang MN. Interferon affects intracellular calmodulin levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;111:430–7.
35. Rainteau D, Sharif A, Bourrillon R. Calmodulin in lymphocyte mitogenic stimulation and in lymphoid cell line growth. *Exp Cell Res* 1987;168:546–54.
36. Van de Kerckhof PCM, Van Erp PEJ. Calmodulin levels are grossly elevated in the psoriatic lesion. *Br J Dermatol* 1983;108:217–18.
37. Wollina U, Klinger R, Wetzker R, Knopf B. Increase of epidermal calmodulin precedes the formation of a psoriatic lesion. *Arch Dermatol Res* 1989;281:73–4.
38. Whitfield JF, Boynton AL, MacManus JP, Sikorska M, Tsang BK. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. *Mol Cell Biochem* 1979;27:155–79.
39. Teshima Y, Kakiuchi S. Membrane-bound forms of calcium ion-dependent protein modulator: Calcium ion-dependent and independent binding of modulator protein to the particulate fraction from brain. *J Cyclic Nucleotide Res* 1978;4:219–31.
40. Heberman E, Crowell K, Janicki P. Lead and other metals can substitute for Ca^{2+} in calmodulin. *Arch Toxicol* 1983;54:61–70.
41. Raos N, Kasprzak KS. Effect of nickel(II) acetate on distribution of calmodulin in rat kidney. *Toxicol Lett* 1989;48:275–82.

42. Raos N, Kasprzak KS. Allosteric binding of nickel(II) to calmodulin. *Fund Appl Toxicol* 1989;13:816–22.
43. Cox JL, Harrison, Jr SD. Correlation of metal toxicity with *in vitro* calmodulin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;115:106–11.
44. Harper JF, Cheung WY, Wallace RW, Huang HL, Levine SN, Steiner AL. Localization of calmodulin in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:366–70.
45. Conn PM, Chafouleas JG, Rogers D, Means AR. Gonadotropin releasing hormone stimulates calmodulin redistribution in rat pituitary. *Nature* 1981;292:264–5.
46. Matsui K, Higashi K, Fukunaga K, Miyazaki K, Maeyama M, Miyamoto E. Hormone treatments and pregnancy after myosin light chain kinase and calmodulin levels in rabbit myometrium. *J Endocrinol* 1983;97:11–9.
47. Gnegy ME, Uzunov P, Costa E. Regulation of dopamine stimulation of striatal adenylate cyclase by an endogenous Ca^{++} -binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3887–90.
48. Hanbauer I, Gimble J, Sankaran K, Sberard R. Modulation of striatal cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin: regulation of opiate and dopamine receptor activation. *Neuropharmacology* 1979;18:859–64.
49. Pujades C, Bastos R, Enrich C, Bachs O. Decrease of calmodulin and actin in the plasma membrane of rat membrane of rat liver cells during proliferative activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:1287–91.
50. Pujol MJ, Soriano M, Coll MJ, Domingo J, Bachs O. New synthesis of cyclic AMP-dependent protein kinases during liver regeneration. *Cell Biochem Funct* 1988;6:203–8.
51. Veigl, ML, Vanaman TC, Sedwick WD. Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1984;738:21–48.
52. Subrahmanyam C, Honn SC, Reed WC, Veer Reddy GP. Nuclear localization of 68 KDa calmodulin-binding protein is associated with the onset of DNA replication. *J Cell Physiol* 1990;144:423–8.
53. Rasmussen CD, Means AR. Calmodulin is required for the cell cycle progression during G_1 and mitosis. *EMBO J* 1989;8:73–82.
54. Boynton AL, Whitfield JF, MacManus JP. Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;95:745–9.
55. Boynton AL, Whitfield JF. The different actions of normal and supranormal calcium concentrations on the proliferation of BALB/c 3T3 mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1651–4.
56. Fisher PB, Weinstein IB. Effects of tumor promoters and extracellular calcium on the growth of normal, transformed and temperature sensitive rat liver epithelial cells. *Cancer Lett* 1980;10:7–17.
57. McKeeban WL, McKeeban KA. Calcium, magnesium and serum factors in multiplication of normal and transformed human lung fibroblasts. *In vitro* 1980;16:475–85.
58. Keith CH, Lin DE, Parsons BH. Inhibition of mitosis in PtK₂ cells by CAPP₁-calmodulin. *Eur J Cell Biol* 1988;47:94–100.
59. Babu YS, Sack JS, Greenbough TJ, Means CE, Cook WJ. Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 1985;315:37–40.
60. Babu YS, Bugg CE, Cook WJ. X-ray diffraction studies of calmodulin. *Meth Enzymol* 1987;139:632–42.

Summary

CALMODULIN LEVELS AND THE CHANGES IN CELL PHYSIOLOGY

Calmodulin is a calcium-dependent regulator protein which activates about thirty enzymatic systems. Its intracellular levels, as well as the distribution between cytosolic and membrane fractions, are dependent on chemical (metal ions) and biological agents (hormones, viruses). The changes in levels are particularly pronounced after the cell transformation. The influence of transformation and the effect of chemical/biological agents are discussed separately as are the analytical methods for calmodulin determination. A detailed mechanism of action of chemical and biological agents on calmodulin levels is not yet known.

Institute for Medical Research and Occupational Health, University of Zagreb, Zagreb

Key terms: calmodulin biosynthesis, intracellular processes, calcium, malignant transformation, modulatory protein, regulation of calcium level, cell metabolism.