

Modifications de l'activité de la protéine kinase C et de la phosphorylation de la lipocortine I dans les cultures de cellules thyroïdiennes porcines

F Antonicelli ¹, B Omri ², MF Breton ², L Martiny ¹, B Rothhut ³,
F Russo-Marie ³, B Lambert ¹, M Pavlovic-Hournac ², B Haye ^{3*}

¹ Université de Reims, UFR sciences, laboratoire de biochimie,
BP 347, 51062 Reims Cedex;

² Unité INSERM 96, 78 rue du général Leclerc, 94275 Paris-Bicêtre;

³ Institut Pasteur, unité INSERM 285, 25 rue du docteur Roux, 75524 Paris cedex 15, France

(15^e réunion du groupe Développement, INRA, Paris, 24-26 mai 1989)

Résumé — En absence d'hormone, les cellules thyroïdiennes en culture se dédifférencient, perdent progressivement leur capacité de capter l'iodure et de l'organifier («cellules contrôles»). La présence de TSH (0,1 mU/ml) permet le maintien des fonctions différenciées en assurant une hyperorganification («cellules TSH»). L'addition de tétradécanoyl phorbol 13 acétate (TPA) entraîne une dédifférenciation rapide des cellules et des modifications importantes des différentes voies de signalisation. L'activité protéine kinase C (pKC), peu affectée dans les «cellules contrôles» et «cellules TSH», est fortement modifiée dans les cellules traitées par le TPA. Après une translocation rapide, l'activité pKC est «désensibilisée» et la phosphorylation des substrats endogènes cytosoliques (35-38 kDa) disparaît. Parmi ces substrats de la pKC nous avons identifié la lipocortine I (LC I) (35kDa). Ces protéines antiphospholipasiqes A₂ font partie de la famille des protéines fixant le Ca²⁺. Par électrophorèse monodimensionnelle (PAGE-SDS) et «électrotransfert» nous avons montré que la LC I est présente dans les fractions particulaires et cytosoliques des cellules. Par électrophorèse bidimensionnelle (PAGE-SDS et IEF) suivie d'un «électrotransfert» nous avons montré que la LC I existe sous 2 formes, une phosphorylée et une non phosphorylée par la pKC. La phosphorylation de cette protéine déplace son pI de 6,9 à 6,6. Les modifications des différentes voies de signalisation, de l'activité de la pKC et de la phosphorylation de la LC I peuvent être, en partie, responsable de la dédifférenciation observée dans les cellules thyroïdiennes porcines cultivées en absence d'hormone ou en présence de TPA.

thyrocyte / dédifférenciation / ester de phorbol / protéine kinase C / lipocortine I

Summary — **Modifications of protein kinase C activity and lipocortin I phosphorylation in pig thyroid cultured cells.** When cultured in the absence of thyreostimulin (TSH), thyroid cells lose some of their differentiated functions such as iodide transport and its incorporation into thyroglobulin. In the presence of TSH (0.1 mU/ml), these differentiated functions are preserved («TSH cells»). The addition of tetradecanoyl phorbol 13 acetate (TPA) inhibits some differentiated functions of the cells and provokes important modifications of bio-signalling pathways. The protein kinase C (pKC) activity, unchanged in «control» and «TSH cells», was dramatically modified in TPA treated cells. After translocation, the pKC activity was down-regulated and the phosphorylation of its endogenous sub-

* Correspondance et tirés à part

strates (35–38 kDa) disappeared. Among these substrates, we identified the lipocortin I (LC I) (35 kDa), a phospholipase A₂ inhibitory protein related to the Ca²⁺ binding protein family. By monodimensional electrophoresis (PAGE–SDS) and western-blot, we evidenced the presence of LCI in cytosols and particulate extracts. By 2 dimensional electrophoresis (PAGE–SDS and IEF) and western-blot we identified a phosphorylated and unphosphorylated LCI protein. The phosphorylation of LCI by pKC decreased its isoelectric point from 6.9–6.6. The modifications of pKC activity and LCI phosphorylation and the changes in the bio-signalling pathways can partly account for the loss of differentiation observed in control or TPA treated cells.

thyrocyte / differentiation / phorbol ester / protein kinase C / lipocortin I

INTRODUCTION

Il est généralement admis actuellement que les cellules thyroïdiennes en culture se dédifférencient quand elles sont maintenues sur milieux dépourvus de tous régulateurs (Kerkof *et al*, 1964; Fayet *et al*, 1971; Lissitzky *et al*, 1971; Mauchamp *et al*, 1980; Roger et Dumont, 1984; Errick *et al*, 1985). Elles ne peuvent être maintenues à l'état différencié que quand elles sont cultivées en présence de la TSH ou de la forskoline (activateur direct de l'adénylate cyclase) (Kerkof *et al*, 1964; Fayet *et al*, 1971; Mauchamp *et al*, 1980; Roger et Dumont, 1984; Errick *et al*, 1985). En ce qui concerne le tétradécanoyl phorbol 13 acétate (TPA), ester de phorbol ayant une action promotrice de tumeurs, ses effets dépendent de la durée de son contact avec les cellules. A très court terme, (< 30 min), le TPA modifie la production de l'AMPc induite par la TSH ou la forskoline (Bachrach *et al*, 1985; Haye *et al*, 1985a; Omri *et al*, 1988). Dans ces mêmes conditions, il stimule également l'incorporation de l'iodure dans les protéines (Levasseur *et al*, 1985). Son effet à long terme se manifeste par une dédifférenciation accélérée des cellules en culture.

Étant donné que le TPA agit principalement par l'activation de la protéine kinase C, qui est son récepteur, nous avons mesuré l'activité de cette enzyme et analysé

la phosphorylation de ses substrats spécifiques dans les cellules exposées au TPA pendant des temps variables. Parmi les substrats de la pKC nous avons identifié la lipocortine de type I dont le poids moléculaire est de 35 kDa.

Nous avons également évalué les taux de médiateurs intracellulaires des 2 voies de régulation de la cellule thyroïdienne (AMP cyclique et phospho-inositides) et comparé l'expression de la principale fonction thyroïdienne (l'incorporation de l'iodure dans les protéines) dans les cellules différenciées et en cours de dédifférenciation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation, culture et lavage des cellules thyroïdiennes

Les cellules thyroïdiennes ont été isolées à partir des glandes de porc, par la technique de trypsinisation discontinue (Mauchamp *et al*, 1980).

La préparation, la culture et le lavage des cellules thyroïdiennes ont été réalisés d'après Haye *et al* (1985a, b).

Préparation des fractions cytosoliques et particulaires

La préparation des fractions cytosoliques et particulaires à partir de cultures thyroïdiennes, ainsi que la mesure de l'activité pKC et la phosphory-

lation des protéines endogènes ont été conduites d'après la technique décrite par Omri *et al* (1988).

Phosphorylation des protéines endogènes in vitro

Électrophorèse monodimensionnelle

Les protéines phosphorylées ont été analysées par électrophorèse en milieu dénaturant (SDS), sur des gels de polyacrylamides (gradient 5–15%) suivant la technique décrite par Laemmli (1970). Après la migration, la lipocortine I a été identifiée par électrotransfert suivant la technique de Rothhut *et al* (1987). Les protéines phosphorylées ont été localisées par autoradiographie.

Électrophorèse bidimensionnelle

La séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée suivant la technique décrite par O'Farrel (1975).

Détermination de l'AMP cyclique, étude du renouvellement des phospholipides, mesure de l'organification de l'iodure

Tous ces paramètres ont été mesurés ou testés selon les méthodes décrites par Haye *et al* (1985b).

L'incorporation de ^{32}P dans les phosphoinositides (PI) sur l'incorporation de ^{32}P dans la phosphatidylcholine (PC) est utilisée comme index (PI/PC) (Gérard *et al*, 1982).

Autres méthodes utilisées

Les protéines ont été mesurées par la méthode de Lowry *et al* (1951); le contenu en ADN a été déterminé selon la méthode de Groyer et Robel (1980) sur une aliquote de 100 μl de l'homogénat.

Expression des résultats, analyse statistique

Les différences statistiques entre les essais ont été calculées en utilisant le test *t* de Student. Les expériences ont été reproduites au minimum 3 fois avec les mêmes résultats. Le résultat d'une expérience significative est présenté. Une valeur de $P < 0,01$ est considérée comme significative dans la comparaison des différentes séries.

RÉSULTATS

Métabolisme des cellules thyroïdiennes en culture après un traitement chronique de deux jours par la TSH (0,1 mU/ml) ou le TPA (10^{-7} mol/l)

Sur l'organification de l'iodure

Dans les cellules cultivées pendant 2 j en présence de TSH, l'incorporation de l'iodure dans les protéines est très fortement augmentée par rapport au contrôle, alors que dans les cellules traitées durant 2 j par le TPA, elle est inhibée (fig 1).

Rapports PI/PC

Dans les «cellules TSH», le rapport PI/PC augmente fortement pendant la culture, alors que dans les «cellules TPA» il diminue d'une façon spectaculaire (fig 1). Ceci est dû aux modifications des renouvellements à la fois du PI et de PC, qui sont très différents dans les «cellules TSH» et «TPA» (fig 2).

Production des prostaglandines E_2

Dans les «cellules TSH», la production des PGE_2 est très inhibée par rapport à celle observée dans les «cellules contrôles».

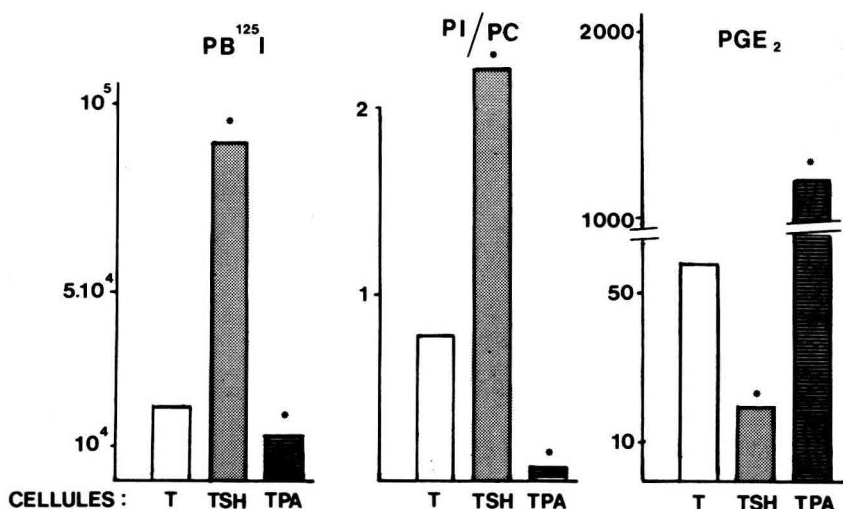


Fig 1. Après 2 j de culture en absence d'agoniste (cellules contrôles «T») ou en présence de TSH (0,1 mU/ml) ou TPA (10^{-7} mol/l), les cellules sont lavées et incubées pendant 45 min en présence de $1 \mu\text{Ci } ^{125}\text{I-Na}$ pour la mesure de l'organification de l'iodure ($\text{PB } ^{125}\text{I}$), pendant 2 h en présence de ^{32}P -orthophosphate pour la mesure du renouvellement des phospholipides (PI = phospho-inositides, PC = phosphatidylcholine), pendant 5 h pour la mesure de la production de PGE_2 (dosage radio-immunologique). Analyse statistique : * $P < 0,001$ par rapport au témoin correspondant.

Par contre, les cellules cultivées en présence du TPA ont une production très élevée de PGE_2 (fig 1).

Production de l'AMPc

Contrairement aux médiateurs de la voie phospholipidique, le taux basal de l'AMPc varie très peu au cours de la culture dans les 3 types cellulaires étudiés (contrôle, TSH, TPA) (résultats non montrés).

Activité de la protéine kinase C (pKC)

Dans les glandes thyroïdes de porc, ainsi que dans les cellules thyroïdiennes en culture, l'activité prédominante des protéines kinases et celle de la pKC. Au cours de la

culture son activité n'est significativement modifiée ni dans les «cellules contrôles» ni dans celles cultivées en présence de TSH. Le TPA, par contre, provoque de très importantes modifications de son activité (fig 3). A court terme, il induit une translocation très rapide de l'enzyme, de la fraction soluble vers la fraction particulaire (fig 4). A partir de 5–10 min (maximum 30 min) l'activité de la pKC disparaît presque complètement (plus de 95%) de la fraction soluble. Cette désensibilisation de la pKC de la fraction soluble est maintenue pendant toute la période de culture des cellules en présence du TPA. Dans la fraction particulaire, l'enzyme transloquée atteint le maximum d'activité entre 15–30 min, puis son activité commence à décroître progressivement. Après 2 j de culture l'activité pKC particulaire est négligeable.

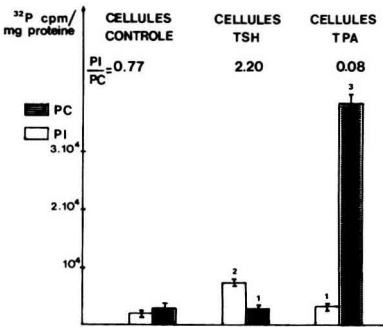


Fig 2. Après 2 j de culture en absence d'agoniste (cellules contrôles «T») ou en présence de TSH (0,1 mU/ml) ou TPA (10^{-7} mol/l), les cellules sont lavées et incubées pendant 2 h en présence de ^{32}P -orthophosphate pour la mesure du renouvellement des phospholipides (PI = phospho-inositides, PC = phosphatidylcholine). Analyse statistique : 1) Non significativement différent du phospholipide correspondant des «cellules contrôles». 2) $P < 0,01$ par rapport au phospholipide correspondant des «cellules contrôles». 3) $P < 0,001$ par rapport au phospholipide correspondant des «cellules contrôles».

La désensibilisation de la pKC dans les cellules cultivées se répercute sur la phosphorylation de ses substrats spécifiques.

Substrats de pKC

Après 2 j de culture, en absence ou en présence de TSH (0,1 mU/ml) ou TPA (10^{-7} mol/l), les substrats de la pKC sont mis en évidence par phosphorylation *in vitro* des protéines de la fraction soluble ou particulaire avec l'ATP- γ - ^{32}P . En présence de calcium et de phospholipides (CaPL), on constate que les substrats majeurs de la pKC, aussi bien dans la fraction soluble (fig 5) que particulaire (non montré), sont les bandes protéiques ayant un poids moléculaire entre 35 et 38 kDa. La phosphorylation de ces protéines est absente des cellules dans lesquelles la pKC est désensibilisée par le TPA pendant 2 j.

Identification de la lipocortine I (LC I) comme un des substrats de la pKC

Récemment (Antoniceilli *et al*, 1988), nous avons purifié et caractérisé dans la thy-

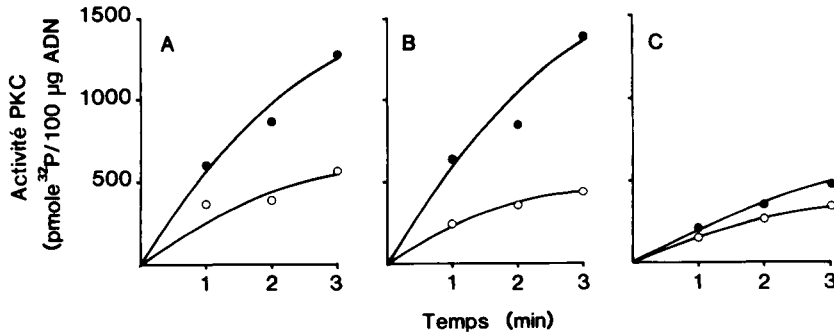


Fig 3. L'activité protéine kinase C a été évaluée en absence (O—O) ou en présence (●—●) de Ca^{2+} et de phospholipides. A : «Cellules contrôles». B : «Cellules TSH». C : «Cellules TPA».

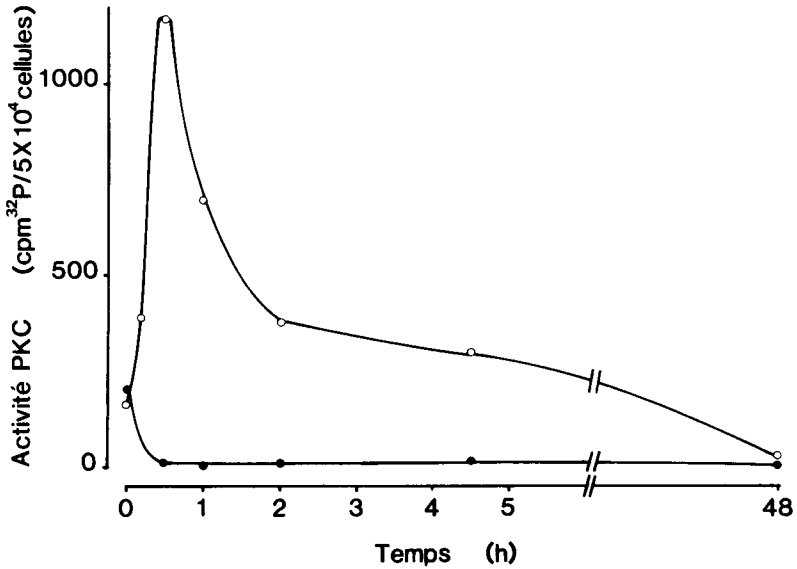


Fig 4. L'activité pKC a été déterminée dans le cytosol (●—●) ou dans les particules (O—O) en présence de Ca^{2+} et de phospholipides.

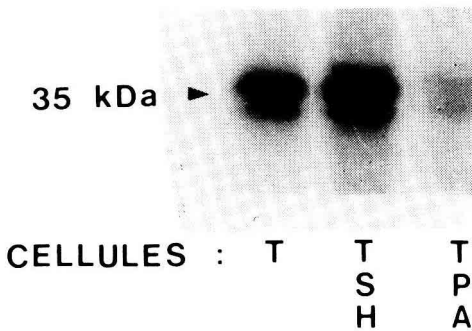


Fig 5. Après les 2 j de culture et la préparation des fractions solubles des différents lots cellulaires, «T», «TSH», «TPA», la phosphorylation des protéines de la fraction soluble par la pKC a été déterminée en présence de Ca^{2+} et de phospholipides. Après incubation de 2 min en présence d'ATP- γ -³²P, les protéines phosphorylées sont analysées d'après la méthode de Laemmli (1970) et localisées par autoradiographie.

roïde une protéine antiphospholipasique A_2 de type lipocortine appelée endonexine (32 kDa). Parallèlement, nous avons mis en évidence une autre lipocortine de type I (35 kDa) et sa protéine core (33 kDa). Comme ces protéines ont des masses molaires analogues à celles des substrats de la pKC, nous avons étudié leur phosphorylation par la pKC. Après phosphorylation par la pKC et électrophorèse en condition dénaturante suivie d'un électrotransfert, et en utilisant l'anticorps antilipocortine I, on constate la présence de la lipocortine de 35 kDa dans les fractions soluble et particulaire provenant des «cellules TSH» et «TPA» (fig 6). Dans la fraction particulaire de ces 2 lots cellulaires, on retrouve également la protéine core de 33 kDa dont la présence est plus importante dans les particules des «cellules TPA» que dans les «cellules TSH».

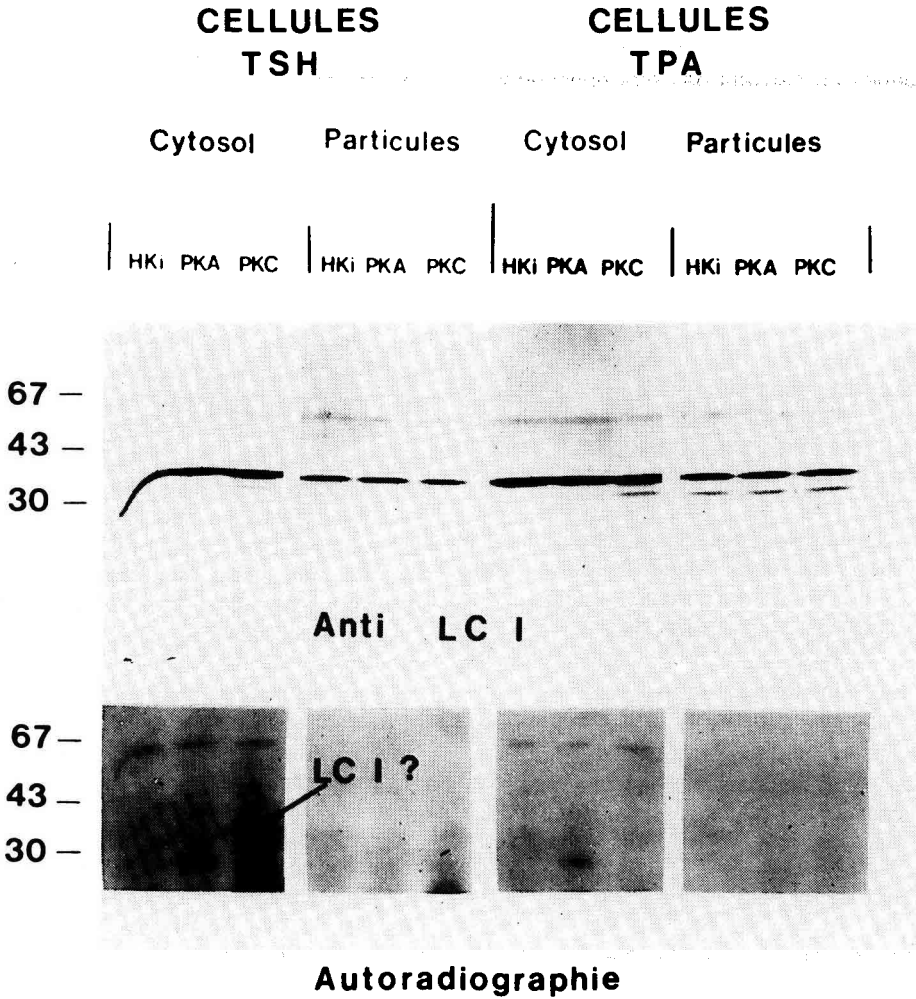


Fig 6. Électrophorèse monodimensionnelle, électrotransfert et autoradiographie des protéines solubles et particulaires après phosphorylation par la pKC. HKi : activité basale en absence de Ca^{2+} et de phospholipides. pKA : phosphorylation par la protéine kinase A. pKC : phosphorylation par la protéine kinase C en présence de Ca^{2+} et de phospholipides. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la figure 5 sauf qu'un électrotransfert a précédé l'autoradiographie.

Après autoradiographie, on constate que la bande de 35 kDa, substrat spécifique de la pKC dans les cellules en culture, est superposable à la bande révélée par l'anticorps antilipocortine.

Afin de mieux préciser la nature des lipocortines phosphorylées par la pKC, une électrophorèse bidimensionnelle suivie d'un électrotransfert a été réalisée sur des extraits protéiques cytosoliques des

«cellules TSH» uniquement, puisque dans les «cellules TPA» les substrats endogènes ne peuvent pas être phosphorylés, la pKC étant désensibilisée. De plus, 4 différents anticorps antilipocortines ont été utilisés : anti 32 kDa (LC V); anti 35 kDa (LC I); anti 36 kDa (LC II) et anti 70 kDa (LC VI).

La coloration de l'électrotransfert par la DAB a révélé la présence des 4 lipocortines (LC I, LC II, LC V, LC VI) dans le cytosol des «cellules TSH» (fig 7, haut). Il faut noter que la lipocortine I (LC I) est présente sous forme d'une tache majeure dont le *pI* est de 6,9 et d'une tache mineure ayant un *pI* de 6,6. Cette dernière n'est présente que lorsque la pKC est activée.

La superposition de l'électrotransfert et de l'autoradiographie (fig 7, bas) a permis de définir les lipocortines phosphorylées par la pKC dans la thyroïde :

— les lipocortines II, V et VI ne sont pas phosphorylées par la pKC (CaPL);

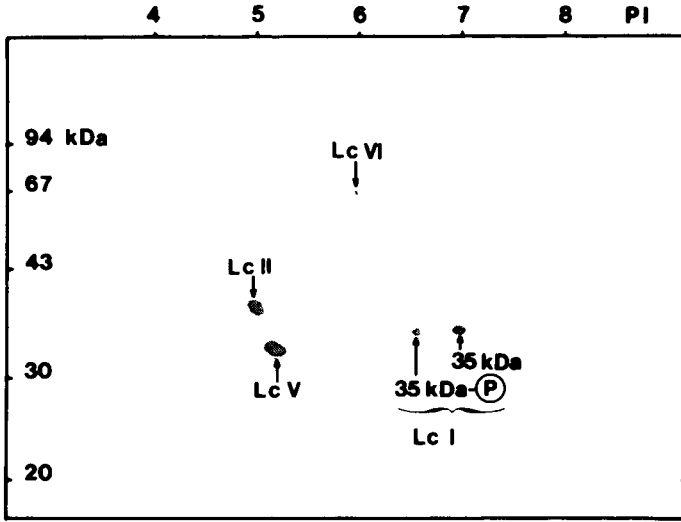
— la lipocortine I existe sous 2 formes, une phosphorylée et une non phosphorylée. La phosphorylation déplace apparemment son point isoélectrique de 6,9 à 6,6.

DISCUSSION

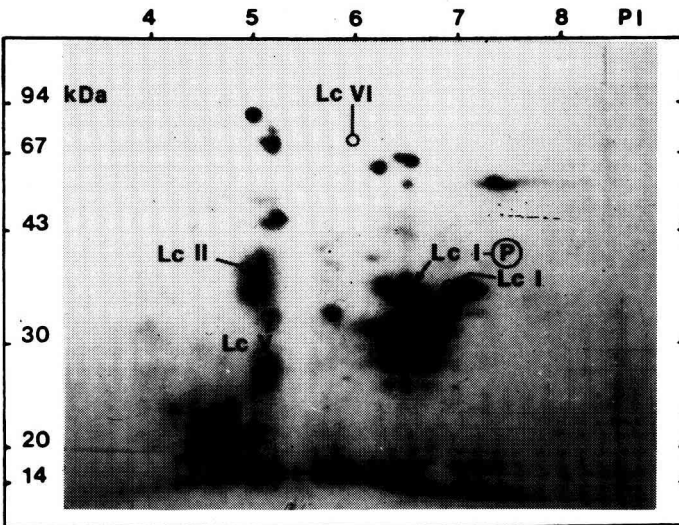
Le traitement pendant 2 j par le TPA (10^{-7} mol/l) des cellules thyroïdiennes en culture provoque des modifications importantes de leur métabolisme, de leur stimulation par l'hormone, et de leur morphologie (Haye *et al*, 1985a; Omri *et al*, 1988). Le niveau basal de la production de cAMP est peu affecté, mais sa stimulation par l'hormone est fortement inhibée. L'incorporation de ^{32}P orthophosphate dans les phospholipides est réorientée vers la phosphatidylcholine, ce qui se traduit par une modification importante du rapport PI/PC observé dans les «cellules contrôles»

ou les «cellules TSH». L'organification de l'iode, élevée dans les «cellules TSH», est inhibée dans les cellules traitées par le TPA. La synthèse de la thyroglobuline est, elle aussi, inhibée alors que celle du collagène de type IV est augmentée (G Bellon *et al*, non publié). De plus, les cellules cultivées en suspension, qui ne se divisent pas, prennent sous l'action du TPA l'aspect de cellules fusiformes et adhèrent progressivement au support.

Après une translocation rapide de la pKC par le TPA, les cellules thyroïdiennes perdent progressivement cette activité. Parmi les substrats endogènes de la pKC, nous avons identifié la lipocortine I (35 kDa) dans les «cellules TSH». Dans les «cellules TPA» ce substrat, toujours présent, n'est plus phosphorylé et ceci se traduit par une dérégulation de l'activité phospholipasique A_2 qui se répercute sur la production des PGE_2 . Dans les «cellules contrôles» et les «cellules TPA», dédifférenciées ou en cours de dédifférenciation, l'activité phospholipasique A_2 est élevée. Elle est faible dans les «cellules TSH». Dans notre système il paraît y avoir une bonne corrélation entre la phosphorylation de la lipocortine I et l'activité de la phospholipasique A_2 , l'absence de phosphorylation est observée dans les cellules TPA où l'activité phospholipasique A_2 est élevée. Ceci est contradictoire avec le modèle précédemment décrit par Hirata (1981). La régulation de l'activité des lipocortines paraît plus complexe qu'un simple mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation. Un contrôle peut intervenir au niveau de l'expression, de la protéolyse ménagée, de la fixation du Ca^{2+} et des phospholipides, de la translocation, de la phosphorylation par d'autres protéines kinases (tyrosine kinase) (Rainteau *et al*, 1988; Davidson *et al*, 1987; Huang *et al*, 1987; Sato *et al*, 1988; Schlaepfer et Haigler, 1987).



WESTERN BLOT A



AUTORADIOGRAPHIE B

Fig 7. Électrophorèse bidimensionnelle, électrotransfert et autoradiographie des protéines solubles des «cellules TSH» après phosphorylation par la pKC. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour les figures 5 et 6 sauf que l'expérience a été arrêtée selon la méthode décrite par O'Farrell (1975). Quatre anticorps ont été testés successivement après l'électrotransfert et avant l'autoradiographie.

Par ailleurs, il n'est pas exclu que ces protéines aient d'autres fonctions biologiques dont la nature, l'importance et la localisation restent à démontrer (pour une synthèse voir Crompton *et al*, 1988).

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame O Legue pour son excellente collaboration technique et Madame Subtil qui a réalisé le manuscrit. Nous remercions également le NIH (Bethesda) et la Sobevir (Rethel, France) qui ont donné respectivement la TSH et les thyroïdes de porc, ainsi que le Docteur J Browning (Biogen, USA) qui nous a fourni gracieusement certains anticorps. Ce travail a été en partie réalisé grâce à des subventions de la Fondation de la recherche médicale et de l'Association pour la recherche sur le cancer et grâce à un contrat avec l'INSERM (CRE n° 874009).

RÉFÉRENCES

- Antonicelli F, Rothhut B, Martiny L, Aguié-Aguie G, Lambert B, Bellon G, Russo-Marie F, Jacquemin C, Haye B (1988) Purification and characterization of phospholipase A₂ inhibitory proteins from pig thyroid gland. *FEBS Lett* 235, 252-256
- Bachrach L, Eggo MC, Mak WW, Burrow GN (1985) Phorbol esters stimulate growth and inhibit differentiation in cultured thyroid cells. *Endocrinology* 116, 1603-1609
- Crompton MR, Moss SE, Crumpton MJ (1988) Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* 55, 1-3
- Davidson FF, Dennist EA, Powell M, Glenney JR (1987) Inhibition of phospholipase A₂ by «lipocortin» and calpactins. *J Biol Chem* 262, 1698-1705
- Erick JE, Eggo MC, Burrow GN (1985) Epidermal growth factor inhibits thyrotropin-mediated synthesis of tissue-specific proteins in cultured ovine thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 43, 51-59
- Fayet G, Michel-Bechet M, Lissitzky S (1971) Thyrotropin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine thyroid cells in culture. Ultrastructural studies. *Eur J Biochem* 24, 100-111
- Gérard C, Haye B, Jacquemin C, Mauchamp J (1982) Chronic and acute effects of thyrotropin on phosphatidylinositol turnover in cultured porcine thyroid cells. *Biochim Biophys Acta* 710, 359-369
- Groyer A, Robel P (1980) DNA measurement by mithramycin fluorescence in chromatin solubilized by heparin. *Anal Biochem* 106, 262-268
- Haye B, Aublin JL, Champion S, Lambert B, Jacquemin C (1985a) Tetradecanoyl phorbol-13-acetate counteracts the responsiveness of cultured thyroid cells to thyrotropin. *Biochem Pharmacol* 34, 3795-3802
- Haye B, Aublin JL, Champion S, Lambert B, Jacquemin C (1985b) Chronic and acute effects of forskolin on isolated thyroid cell metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 43, 41-50
- Hirata F (1981) The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J Biol Chem* 256, 7730-7733
- Huang KS, McGray P, Mattaliano RJ, Burne C, Pingchang Chow E, Sinclair LK, Pepinski RB (1987) Purification and characterization of proteolytic fragments of lipocortin I that inhibit phospholipase A₂. *J Biol Chem* 262, 7639-7645
- Kerkof PR, Tong PJ, Chaikoff IL (1964) *In vitro* effects of thyrotropic hormone. I. On the pattern of organization of monolayer cultures of isolated sheep thyroid gland cells. *Endocrinology* 74, 170-179
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Levasseur S, Morgan L, Friedman Y, Burke G (1985) Forskolin and 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate mimic thyrotropin-stimulated protein iodination in mouse thyroid. *Biochem Biophys Res Comm* 128, 858-863
- Lissitzky S, Fayet G, Giraud A, Verrier B, Torresani J (1971) Thyrotropin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine thyroid cells. Mechanism of action of

- thyrotropin and metabolic properties. *Eur J Biochem* 24, 88-99
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Mauchamp J, Chambard M, Gabrion J, Pelassy C (1980) Polarisatión morphologique et fonctionnelle d'un épithélium simple en culture : le modèle thyroïdien. *CR Soc Biol* 174, 241-256
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021
- Omri B, Breton MF, Haye B, Jacquemin C, Pavlovic-Hournac M (1988) Phorbol ester prevents the thyroid-stimulating-hormone-induced but not the forskolin-induced decrease of cAMP-dependent protein kinase activity in thyroid cell cultures. *Eur J Biochem* 175, 125-133
- Rainteau DP, Weinman SJ, Kabaktchis CAM, Smith VL, Kaetzel MA, Dedman JR, Weinman JS (1988) The expression of the 35- and 67 kDa calcimedins is dependent on thyroid hormone. *J Biol Chem* 263, 12844-12848
- Roger PP, Dumont JE (1984) Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 36, 79-93
- Rothhut B, Comera C, Prieur B, Errasfa M, Minassian G, Russo-Marie F (1987) Purification and characterization of a 32-kDa phospholipase A₂ inhibitory protein (lipocortin) from human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett* 219, 169-175
- Sata EF, Okimasu E, Takahashi R, Miyahara M, Matsuno T, Utsumi K (1988) Lipocortin-like 33 kDa protein of guinea pig neutrophil. Its distribution and stimulation-dependent translocation detected by monoclonal anti-33 kDa protein antibody. *Cell Struct Funct* 13, 89-96
- Schlaepfer DD, Haigler HT (1987) Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J Biol Chem* 262, 6931-6937