

BÉTA-RECEPTOR STIMULÁCIÓ HATÁSA EGÉR LIMFOCITÁK
CIKLIKUS ADENOSZIN-MONOFOSZFÁT SZINTJÉRE
ÉS MIGRÁCIÓJÁRA

Doktori értekezés

Hulesch Helga

Készült: az MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézetében

Szeged, 1981



TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
BEVEZETÉS	1
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1. A cAMP szerepe a hormonhatás közvetítésében	3
1.2. A cAMP és az immunfolyamatok szabályozása	6
1.3. A cAMP hatása a spontán migrációra	7
1.4. A cAMP alapszint szabályozása	9
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	12
2.1. Kísérleti állatok	12
2.2. Felhasznált vegyszerek	12
2.3. Sejtszuszpenzió készítése	13
2.4. T és B limfociták szeparálása	14
2.5. T limfociták azonosítása anti Thy 1.2 savóval	14
2.6. Az intracelluláris cAMP szint meghatározása	15
2.7. Migrációs teszt	16
2.8. CBA és CBA nude/+ egerek elkülönítése	17
2.9. Az eredmények statisztikai értékelése	18
3. EREDMÉNYEK	19
3.1. Noradrenalin és izoproterenol hatása a limfociták intracelluláris cAMP szintjére	19
3.2. Az intracelluláris cAMP szintet befolyásoló alfa- és béta-adrenerg stimulánsok hatása a limfociták spontán migrációjára	23
3.3. Leukémiás egerek limfocitáinak cAMP szintje és migrációja	29
3.4. A cAMP szint regulációjának genetikai vonakozásai	32
4. MEGVITATÁS	37
4.1. A sejtfelszíni receptorok szerepe a cAMP szint hormonstimulálhatóságában	37
4.2. Az intracelluláris cAMP szint és a limfociták spontán migrációja közti korreláció	38



4.3. A limfómás állatokból származó limfociták anomális viselkedése	40
4.4. A sejtek cAMP alapszintjének és a stimulálha- tóság mértékének genetikai determináltsága	41
ÖSSZEFOGLALÁS	44
IRODALOMJEGYZÉK	45

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni az Immungenetikai Csoport vezetőjének, Fachet Józsefnek értékes utmutatásait. Köszönettel tartozom továbbá Berki Sándornak és Gyenes Jánosnak a migrációs kísérletek elvégzése során nyújtott segítségükért és tanácsaikért.

B E V E Z E T É S

A hatvanas évek eleje, a ciklikus adenosin-monofoszfát /cAMP/ hormonhatást közvetítő funkciójának felismerése óta egyre több celluláris szintű fiziológiai folyamatban sikerült ciklikus nukleotidok szabályozó szerepét bizonyítani. Az irodalomban több olyan adat ismert, amely valószínűsíti, hogy az immunválasz hormonálisan is szabályozott, és hogy ez a szabályozás a limfociták szintjén a cAMP közvetítésével valósul meg.

Különböző kísérleti objektumok esetében sikerült korrelációt kimutatni a hormonstimuláció és az intracelluláris cAMP szint között, illetve a cAMP szint és a limfociták egyes élettani folyamatai, pl. citolitikus aktivitás, spontán migráció stb. között. A kiterjedt vizsgálatok eredményeként egyrészt sikerült e szabályozás számos részletét megismerni, másrészt viszont az eltérő kísérleti megközelítés és a vizsgált állatok különbözősége miatt kellő mennyiségű, közvetlenül összehasonlítható, és így megfelelő áttekintést nyújtó adat nem állt rendelkezésre.

Célul tűztük ki, hogy egér limfocitákkal olyan kísérleti rendszert dolgozzunk ki, amellyel a cAMP rendszer működési mechanizmusa és fiziológiai hatása összefüggéseikben vizsgálhatók, továbbá ezeknek az összefüggéseknek az



ismeretében lehetővé teszi a cAMP szintjén megvalósuló reguláció több, eddig ismeretlen részletének tanulmányozását.

Munkánk során katekolamin típusu vegyületek esetében meghatároztuk a cAMP szint stimulálhatóságát befolyásoló tényezőket. Megállapítottuk, hogy a cAMP szint növekedés létrejöttében az egyes adrenerg receptorok, illetve a T és B limfociták milyen mértékben vesznek részt. Direkt mérésekkel nyert adatainkat összehasonlítottuk egy élettani folyamat, a spontán migráció kapcsán tapasztalt változásokkal. Adatainkból következtetéseket tudtunk levonni mind a limfociták cAMP szintjének örökletes szabályozása, mind a rosszindulatu elváltozáson átment limfociták regulációs mechanizmusaira vonatkozóan.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Jóllehet a cAMP sejten belüli mediátorként történő felfedezése óta /SUTHERLAND és RALL, 1960/ e vegyületnek a hormonhatás közvetítésén túl számos alapvető életfolyamatra /növekedés, osztódás/ gyakorolt hatását is leírták, a terjedelmes irodalomból csupán azokat a részeket igyekszem áttekinteni, amelyek munkámmal kapcsolatosak, illetve annak megértését segítik.

1.1. A cAMP szerepe a hormonhatás közvetítésében

A cAMP /ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfát/ egyik legismertebb fiziológiai szerepe, hogy bizonyos sejtfelületi receptorokon ható hormonok hatását közvetíti a sejtek intracelluláris állománya felé. A cAMP rendszer mint másodlagos közvetítő az eddigi ismeretek alapján vázlatosan a következő mechanizmussal működik:

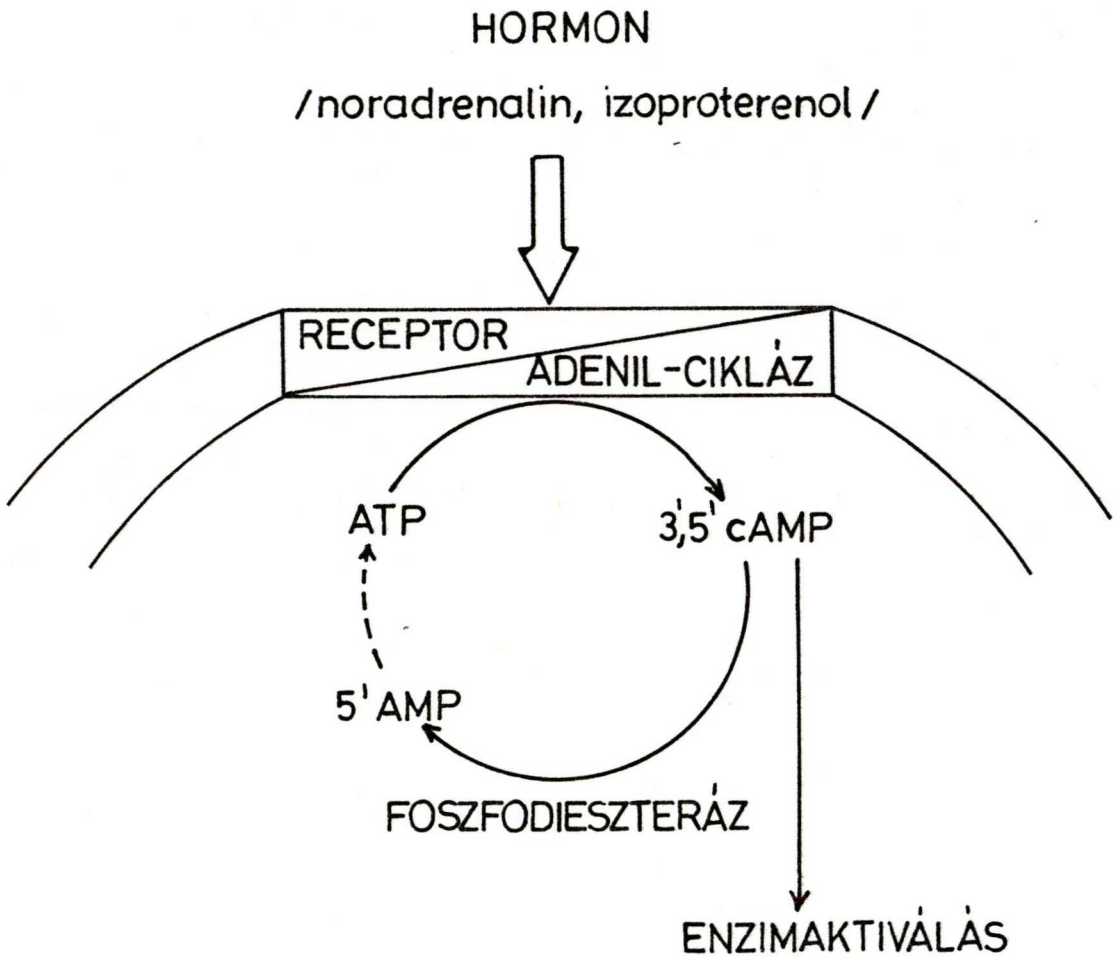
A hormonoknak a megfelelő membrán-receptorokhoz való kapcsolódása révén aktiválódik a sejtmembránban lévő adenil-cikláz enzim, amely az ATP - 3',5'cAMP átalakulást katalizálja. A keletkező ciklikus nukleotid a megfelelő enzimek működését közvetlenül /allosztérikus módon/, vagy közvetve /cAMP-függő protein-kináz révén/ szabályozza. A cAMP metabolizmus másik fontos enzime a citoplazmában ta-

lálható ciklikus nukleotid foszfodieszteráz, a 3',5' cAMP-t mediátorként hatástalan 5'AMP-vé alakítja át. A szintézis és lebontás e két enzimének egymáshoz viszonyított aktivitása az intracelluláris cAMP szint fő meghatározója /1.ábra/.

Azok a hormonok, amelyek hatásukat a cAMP rendszeren keresztül fejtik ki, többségükben az ún. gyorsan ható hormonok /pl. ACTH, katekolaminok, prosztaglandinok stb./ kategóriájába sorolhatók /BUTCHER és mtsai, 1972/.

Felmerült a kérdés, hogy milyen mechanizmus biztosíthatja a különböző hormonok differenciált hatását olyankor, amikor a sejt többféle, cAMP-mediált hormonnal kerül kapcsolatba. Számos esetben sikerült bizonyítani, hogy a differenciált hormonhatás több különböző, eltérő specifikitású felszíni receptor révén valósul meg. Végössorban egy hormon hatásának mértékét az szabja meg, hogy az adott hormon milyen mértékben képes kötődni az adott specifikitású receptorokhoz, illetve az, hogy hány ilyen receptor található a sejtfelszínen.

Az ún. adrenerg receptorok, melyeken keresztül az általunk vizsgált katekolamin vegyületek hatnak, alfa illetve béta típusúak lehetnek. Ez a két csoport a hormonspektrum egyes tagjaival szembeni eltérő affinitásában különbözik /1.táblázat/.



1. ábra. A cAMP rendszer működésének vázlata

1.táblázat. Az alfa- és béta-adrenerg receptorok jellemzői.
/A stimuláló vegyületek esetében az affinitási viszonyokat is feltüntettem./

alfa recep- tor	stimuláló hatás	adrenalin>noradrenalin>izo- proterenol
	blokkoló hatás	regitin /fentolamin/
béta recep- tor	stimuláló hatás	izoproterenol>adrenalin>nor- adrenalin
	blokkoló hatás	propranolol, alprenolol

1.2. A cAMP és az immunfolyamatok szabályozása

A cAMP a sejtek számos élettani funkcióját befolyásolja. Az immunrendszer sejtjei esetében közvetlenül ki-mutatható volt a hatása a limfociták citolitikus aktivi-tására /HENNEY és mtsai, 1972/, a hisztamin felszabadi-tásra /BOURNE és mtsai, 1972/, a sejtek spontán migrá-ciójára /ABELL és MONACHAN, 1973; PASTAN és mtsai, 1975/stb. A sejtosztódás szabályozásában betöltött szerepét mitogének *in vitro* adása után /BURLESON és SAGE, 1976; VISCHER, 1976/, illetve antigénnel *in vivo* végzett sti-mulálás után /YAMAMOTO és WEBB, 1975; SKELLY és mtsai, 1978/ is megfigyelték. Az említett funkciók és a cAMP

szint közti korreláció alapján feltételezték, hogy a limfociták bizonyos élettani funkciói - a CAMP közvetítésével - hormonális szabályozás alatt állnak. Ezért többen vizsgálták a szervezetben előforduló hormonok hatását a limfociták CAMP szintjére.

A vizsgálatok részben annak megállapítására irányultak, hogy egy stimuláló hormon milyen típusu felszíni receptorok közvetítésével fejti ki hatását. Elsősorban az alfa- és béta-adrenerg receptorokat vizsgálták. MAKMAN /1971/ leírta, hogy limfocitáknál a katekolamin típusu hormonok elsősorban béta-adrenerg hatásuak, és ily módon növelik a sejtek adenil-cikláz aktivitását. Mivel a kísérlet során az adenil-cikláz enzim aktivitását mérték, amely a CAMP szintnek csak egyik meghatározója, az adatokból nem lehetett egyértelmű következtetést levonni a CAMP szintre vonatkozóan. Ezért WELSCHER és CRUCHAUD /1978/, valamint BUSSOLINO és mtsai /1980/ direkt mérésekkel is bizonyították a CAMP szint emelkedését katekolamin stimuláció hatására. WELSCHER és CRUCHAUD egér makrofág sejtekben, BUSSOLINO és mtsai egér leukocitákban határozták meg a béta-adrenerg stimuláció hatását.

Másrészt vizsgálták az egyes limfocita szubpopulációk hormon-stimulálhatósága közötti különbségeket is. E kísérletekben timuszhiányos "nude" /tulnyomóan B sejtek-



kel rendelkező/ mutáns egerekből, valamint vad /nude +/+/ kontrollból származó limfocitákat hasonlítottak össze. YAMAMOTO és WEBB /1975/, valamint KATELEY és mtsai /1975/ eredményeikből egyaránt a T limfociták fokozottabb stimulálhatóságára következtettek. Direkt összehasonlítást is lehetővé tettek azok a kísérletek, amelyekben különböző emlősökből származó, szeparált T, illetve B limfocitákkal dolgoztak. MAKMAN /1971/ és BACH /1975/ egyaránt a T sejtek fokozottabb izoproterenol-érzékenységét figyelte meg. NIAUDET és mtsai /1976/ emberi limfocitákon is végeztek hasonló kísérleteket. Mind a timusziányos állatokkal, mind a szeparált sejtekkel végzett kísérletek a T sejtek fokozott katekolamin érzékenységét mutatták.

1.3. A cAMP hatása a spontán migrációra

A sejtek mozgásában a mikrotubulus - mikrofilamentum rendszer fontos szerepet játszik /ALLISON és mtsai, 1971/. Ezzel összhangban BHISHEY /1971/ azt találta, hogy a mikrofilamentum károsító citokalazin B-vel a makro-
rofágok migrációja gátolható, míg a mikrotubulus-képzést gátló kolhicin fokozza azt. Mivel a cAMP egyik fontos fiziológiai hatása, hogy a cAMP-függő protein-kináz enzim stimulációja révén elősegíti a mikrotubulusok képződését,

többen vizsgálták, hogy van-e összefüggés a cAMP szint és a sejtek migrációs képessége között.

KOOPMAN és mtsai /1973/, HIGGINS és mtsai /1976/ a migrációgátló faktor /MIF/ hatására bekövetkező migráció-gátlás és a cAMP szint kapcsolatát tanulmányozták. HIGGINS eredményeiből arra következtetett, hogy a MIF nem a cAMP rendszeren keresztül hat, míg KOOPMAN adatai szerint a MIF migrációgátló hatása dibutiril-cAMP-vel, izoproterenollal és adrenalinnal felfüggeszthető.

A spontán migráció dibutiril-cAMP, cAMP, illetve a foszfodieszteráz-gátló teofillin hatására bekövetkező változását tanulmányozták PICK és mtsai /1973, 1974/. Kísérleteik szerint ezek a vegyületek gátolják a makrofág sejtek spontán migrációját. SCHREINER és UNANUE /1975/ szintén migrációgátlást mutattak ki a limfocitákon dibutiril-cAMP, izoproterenol és teofillin jelenlétében. Leírták ugyanakkor, hogy kolhicines előinkubálás után ez a hatás nem figyelhető meg. Ez arra utal, hogy a cAMP-nek a sejtek migrációjára gyakorolt hatása valamilyen módon a mikrotubuláris rendszeren keresztül valósulhat meg.

1.4. A cAMP alapszint szabályozása

A cAMP rendszernek a hormonhatás közvetítésében betöltött szerepe miatt fontossá vált azoknak a géneknek a

megismerése, amelyek a sejtek cAMP szintjének kialakításában résztvesznek. A cAMP szintézisét és lebontását végző adenil-cikláz és foszfodieszteráz génjein, illetve az ezek expresszióját befolyásoló géneken kívül minden olyan gén szerepet játszhat a cAMP alapszint kialakításában, amelynek termékei a közvetlen prekursor ATP szintjét befolyásolhatják.

A cAMP szint és az egyes immunreakciók közti korreláció vizsgálata során a cAMP alapszint regulációjának problematikáját arra a kérdésre igyekeztek leszűkíteni, hogy az alapszint kialakításában meghatározó szerepük van-e az immunválaszt befolyásoló, vagy ezekkel regulatív kapcsolatban álló géneknek. Ezen belül is nagy figyelmet fordítottak az egerek genetikailag jól leírt H-2 hisztokompatibilitási génkomplexére.

A H-2 régió génjei kódolják az ún. erős hisztokompatibilitási antigéneket, ezen kívül szerepet játszanak több fontos immunológiai vonatkozású folyamat /pl. immunreakciók erőssége/ meghatározásában. A H-2 génkomplex tanulmányozása céljából számos olyan beltenyésztett egértörzset hoztak létre, amelyek genomja csak a H-2 régióban különbözik. Ilyen kongenikus törzsek segítségével sikerült ezt a régiót viszonylag részletesen feltérképezni /SHREFFLER és DAVID, 1975; BENACERRAF és KATZ, 1975/. Tekintettel arra, hogy ennek a kromoszóma-régiónak

a génjei meghatározóak egyes sejtfelszíni antigének és receptor-strukturák létrejöttében, kézenfekvő volt összefüggést keresni a cAMP metabolizmus és a H-2 gének között.

MERUELO és EDIDIN /1975/ azt vizsgálták, hogy jelentős szerepet játszanak-e a H-2 régió génjei a cAMP alapszint kialakításában. Vizsgálataikat egér májsejteken végezték. Eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy a cAMP alapszint nem függ alapvetően a genetikai háttértől, ezzel szemben legalább kettő, a H-2 régióhoz tartozó gén jelentősen befolyásolja azt. Ugyanilyen vizsgálati rendszeren végzett kísérletek alapján LAFUSE és mtsai /1979/ azt feltételezték, hogy legalább kettő, a H-2 génkomplexhez tartozó, és egy, attól független gén felelős elsősorban a cAMP alapszint kialakításáért.

Mivel ezek a munkák nem adnak egyértelmű képet a cAMP alapszint kialakításában fontos génekről, továbbá feltételezhető, hogy a még nem vizsgált limfoid sejtekben más szabályozási mechanizmusok is működhetnek, az egyértelműbb kép kialakításához szükségesnek látszik hasonló jellegű vizsgálatok elvégzése limfocitákon is.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben felhasznált egértörzsek: B 10, B 10.A, B 10.R III, A/Ph, AKR/J, CBA és a CBA egértörzs egy timuszhiányos /nude/ mutánsa.

A kísérletek tulnyomó részében 12-16 hetes egereket vizsgáltunk. Az AKR/J törzsből származó egerek 2, illetve 8-10 hónaposak voltak. A megfelelő összehasonlításokat mindig azonos ivaru kísérleti állatokkal végeztük.

Az egyes törzsek szülőpárjait Prágából, a Kísérleti Biológiai és Genetikai Intézetből, Pavel Iványitól kaptuk, és az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének konvencionális állatházában, kontrollált körülmények között tenyésztettük.

2.2. Felhasznált vegyszerek

A kísérleteink során használt finomvegyszereket az alábbi cégek forgalmazták: dibutiril-3',5'-ciklikus-adenozin-monofoszfát, izoproterenol /bitartarát ill. klóríd/, noradrenalin /bitartarát/, DL-propranolol:



Sigma Chemical Co.; regitin /fentolamin/: Hassle /Svédország/; teofillin: Calbiochem; borju főtál-savó /FCS/: Gibco; FT 242 nylon vatta: Fenwal Labs. /USA/. A Parker TC-199 tápfolyadékot az Országos Közegészségügyi Intézetől vásároltuk.

2.3. Sejtszuszpénzió készítése

A kísérleti állatokból - cervikális diszlokáció után - a regionális nyirokcsomókat /auricularis, brachialis, axillaris/, a lépét és a timuszt azonnal eltávolítottuk és 4°C-os TC-199 tápfolyadékban feltárva sejtszuszpénziót készítettünk belőlük. A kötőszöveti aggregátumok eltávolítása céljából a szuszpenziót steril nylonhálón átszűrtük.

A nyirokcsomókból és a timuszból származó sejteket ezután TC-199 tápoldatban óvatos centrifugálás /100g, 8 perc, 4°C/ mellett kétszer mostuk, majd ezt követően beállítottuk a megfelelő milliliterenkénti sejtszámot. A sejtek túlélése a tripánkék kizárásos teszt alapján $90 \pm 5\%$ -os volt.

A lépből származó sejtszuszpénziót TC-199 médiumban reszuszpéndáltuk és a vörösvértesteket háromszoros mennyiségű 0,83%-os NH_4Cl oldattal hemolizáltuk /5 perc, 27°C, 5 perc, 0°C/. Centrifugálás /100g, 8 perc, 4°C/ és

TC-199 tápoldattal végzett kétszeri mosás után a sejteket 15% FCS-t tartalmazó TC-199-ben szuszpendáltuk.

2.4. T és B limfociták szeparálása

A T és B limfociták elkülönítését a JULIUS és mtsai /1973/ által leírt módon végeztük.

Az előkészített FT vattával töltött oszlopot /1x6 cm/ friss tenyésztő médiummal kétszer mostuk, majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Ezután vittük fel a mintegy 10^8 sejtet tartalmazó szuszpenziót /2 ml/. További 30 perces inkubálás után lassan eluáltuk a T sejteket /azonos tápfolyadék 10 ml eluciós térfogat, 14-20 perc/. Ezután további 15 ml tápfolyadékkal átmostuk az oszlopot. A vattát az oszlopból kiszedve és TC-199 médiumban jól szétrázva nyertük vissza a B sejteket. Az elkülönítés hatékonyságát anti Thy 1.2 savóval ellenőriztük.

2.5. T limfociták azonosítása anti Thy 1.2 savóval

Az anti Thy 1.2 savót REIF és ALLEN /1966/ módszere alapján CBA timuszsejtekkel immunizált AKR egerekből nyertük. Az összegyűjtött savót 56°C-on 30 percig inaktiváltuk és -20°C-on tároltuk.

A limfociták kezelését két lépésben végeztük

OKUMURA és mtsai /1976/ módszere szerint. Az anti Thy 1.2 szérumot TC-199 médiummal 1:20 arányban hígítottuk és 1:1 arányban elkevertük 5×10^6 sejt/ml-es sejtszuszpenzióval, majd 30 percig 37°C -on inkubáltuk. Centrifugálás után /100g, 8 perc/ a sejteket 1:20 arányban hígított tengerimalac savót tartalmazó Dulbecco PBS-ben / CaCl_2 -vel és MgCl_2 -vel kiegészített PBS/ vettük fel, és ismét inkubáltuk 37°C -on 30 percig.

A fenti módszerrel végzett kezelés a timusz sejtek 92-95%-át elpusztította. Az élő sejtek arányát tripánkék kizárási teszt alapján határoztuk meg.

2.6. Az intracelluláris cAMP szint meghatározása

A cAMP szintet 100-100 μl , $2,5 \times 10^6$ sejtet tartalmazó szuszpenzióból határoztuk meg. Centrifugálás /120g, 4°C , 10 perc/ után a sejtekhez 500 μl triklórecetsavat adtunk, majd félórai állás után homogenizáltuk és ismét centrifugáltuk /2100g, 4°C , 10 perc/ a csövek tartalmát. A felüluszót háromszori dietiléteres extrakciót követően liofilizáltuk. A cAMP mennyiséget a STEINER /1972/, ill. TOVEY és mtsai /1974/ által leírt, adott mennyiségű ^3H jelölt cAMP specifikus aktivitásának csökkenésén alapuló módszer segítségével, Amersham TRK 432 KIT-tel határoztuk meg.

A hormon-stimuláció vizsgálatakor a sejteket - a cAMP kivonást megelőzően - 1, 2, 3 ill. 5 percre 37°C-on inkubáltuk a stimulátorokkal. A kontrollokat ugyanígy kezeltük, azonos mennyiségű hormonmentes TC-199 tápoldatban. A hormon-antagonisták hatásának tanulmányozásakor a sejteket ezekkel 37°C-on 3 percre előinkubáltuk. Az irodalmi adatok és az előkísérletek alapján az izoproterenolt, noradrenalint, propranololt és alprenololt 5×10^{-5} M, a regitint 2×10^{-5} M koncentrációban alkalmaztuk.

2.7. Migrációs teszt

A migráció vizsgálatát a FRIEDMAN /1969/ által leírt módon végeztük. A kísérleti anyagot 4-4 állatból izoláltuk, a kísérleteket 4 alkalommal megismételtük.

A lépéből, timuszból, illetve nyirokcsomókból származó sejtszuszpenzió koncentrációját az utolsó centrifugálás után $1,25 \times 10^8$ sejt/ml-re állítottuk be. Ezt a limfocita szuszpenziót 0,85 mm átmérőjű üvegkapillárisokba töltöttük, majd a kapillárisokat egyik végükön paraffinnal lezárva, 100g-vel 6 percre 4°C-on centrifugáltuk. Ezt követően a kapillárisokat a sejt-felülszó határon elvágtuk, s a sejteket tartalmazó kapillárist szilikonzsírral műanyag migrációs kamrába rögzítettük. A kontrollt

tartalmazó kamrákba 2 ml 15% FCS-t és antibiotikumot tartalmazó TC-199 tápfolyadékot, a többiekbe a vizsgált hatóanyagra nézve 10^{-5} - 10^{-3} M koncentrációju azonos tápoldatot töltöttünk. A kamrákat 5% CO_2 -t tartalmazó légtermosztátban 37°C -on inkubáltuk 20 órán át. A hormon-antagonisták vizsgálatakor ezekkel 10 percig előinkubáltuk a sejteket.

A kapillárisokból kivándorolt sejtek által létrehozott migrációs mezőt kivetítettük, területét meghatároztuk.

A migráció-gátlás mértékét az un. migrációs indexszel /MI/ adtuk meg:

$$\text{MI} = \frac{\text{kezelt sejtek migrációs területe}}{\text{kezeletlen sejtek migrációs területe}} \times 100$$

2.8. Nude/+ és +/+ CBA egerek elkülönítése

A nude egerek vizsgálatakor vad kontrollként lehetőleg testvér egyedeket használtunk. Mivel a CBA nude/+ és +/+ egerek fenotipusosan megegyeznek, szükséges volt a kontrollként használt homozigóta állatok elkülönítése. Ezt a vérben lévő eltérő fehérvérsejtszám tette lehetővé. Az egerek szemzugi vénájából történt vérvétel után Bürker-kamrával meghatároztuk a fehérvérsejtszámot. A ml-enként 4000-6000 fehérvérsejtszámmal rendelkező egereket heterozigótáknak, a 8000-1000 fehérvérsejtszámmal rendelkezőket



homozigótáknak tekintettük /Iványi P., személyes közlés/.
Az ilyen alapon történő elkülönítés megbízhatóságát keresztelési kísérleteink is alátámasztották.

2.9. Az eredmények statisztikai értékelése

A kísérleti adatok különbségeinek szignifikanciáját a Student-féle kétmintás t-teszttel határoztuk meg.

.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Noradrenalin és izoproterenol hatása a limfociták intracelluláris cAMP szintjére

Annak eldöntésére, hogy az alfa- és béta-adrenerg receptorok milyen mértékben vesznek részt a hormonhatás közvetítésében, olyan hormonok illetve hormonanalógok hatását vizsgáltuk, amelyek szelektíven stimulálják a különböző receptorokat. Az ismert hatásmechanizmusu szimpatikus mediátorok közül az elsősorban alfa-receptor stimuláló noradrenalint használtuk. Mivel az adrenalin az alfa- és béta-receptorok közvetítésével is hat, a béta-receptor-hatást izoproterenollal, egy csak béta-receptort stimuláló hormonanalóggal vizsgáltuk. A hormonok megfelelő receptorokhoz való kötődését a specifikusan alfa-receptor blokkoló regitinnel illetve a béta-receptor blokkoló propranolollal és alprenolollal ellenőriztük úgy, hogy az ezekkel történt előinkubálás után megisméltük a kísérleteket.

Megvizsgáltuk a két fő limfocita szubpopuláció, a T és B sejtek cAMP alapszintjében és stimulálhatóságában jelentkező különbséget. Erre lehetőséget nyújtott a CBA egértörzs egy kongenitálisan timuszhiányos /"nude"/ mu-

tánsa, amely erősen csökkent T sejtszámmal rendelkezik. A nude egerek limfocitáinak cAMP tartalmát a kontrollként használt CBA vad típusu egerekével hasonlítottuk össze, és ebből következtettünk a T és B limfociták cAMP alapszintje és stimulálhatósága közötti különbségre.

Kísérleteinkben a cAMP alapszintje közel azonosnak bizonyult a kontroll és a nude egerek limfocitáiban. Noradrenalin kezelés hatására a cAMP szint szignifikánsan megnőtt mind a kontroll, mind a nude egerek limfocitáiban /2.ábra, 2.táblázat/. Az emelkedés regitinnel /alfa-receptor blokkoló/ nem befolyásolható, ugyanakkor a béta-receptor blokkoló propranolollal végzett előinkubálás után nem figyelhető meg. Ez erősen valószínűsíti, hogy a noradrenalinnak ez a hatása a béta-receptorokon keresztül jön létre. A hormonmentes kontroll cAMP szintje az inkubálás ideje alatt számottevően nem változott.

A cAMP szint izoproterenol hatására is megnőtt, mind a nude, mind a kontroll egerek limfocitáiban, szignifikánsan eltérő mértékben. Az, hogy ez a stimuláció propranolollal gátolható volt, arra utal, hogy ez a hatás szintén béta-adrenerg természetű. /Az ugyancsak béta-receptor blokkoló alprenolollal végzett kísérletek azonos eredményt adtak./

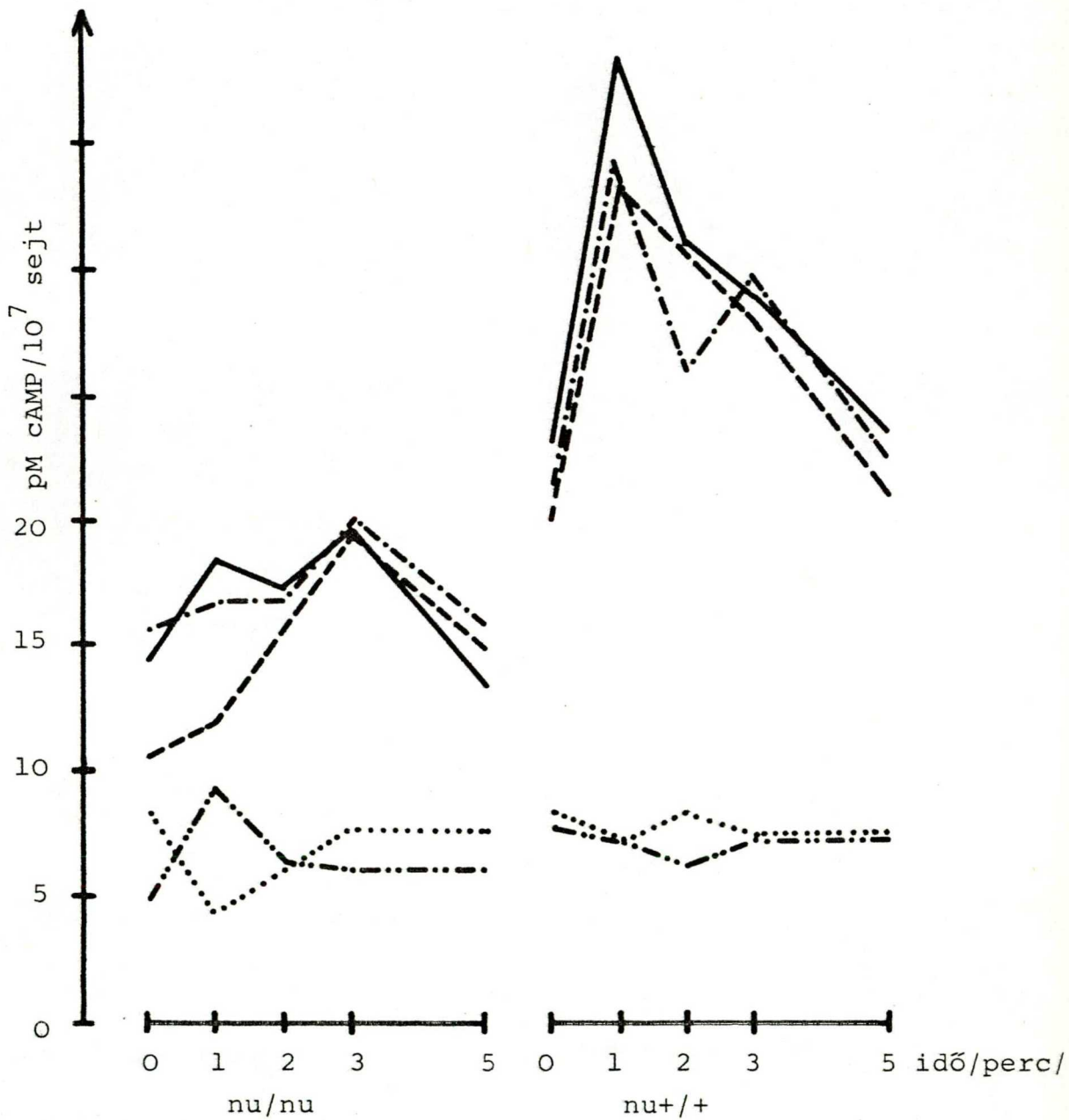
Az, hogy ilyen irányú szignifikáns különbség mutat-



2. táblázat. Izoproterenol és noradrenalin hatása a limfociták intracelluláris cAMP szintjére. A táblázatba foglalt értékek 4-7 független, 12-21 állattal végzett kísérlet eredményeinek átlagai.

	Stimulációs index			
	noradrenalin	noradrenalin + regitin	izoprotere- nol	izoproterenol + propranolol
nu/nu	3,14 $\pm$ 0,87	3,82 $\pm$ 1,29	3,4 $\pm$ 1,2	1,25 $\pm$ 0,28*
nu+/+	5,16 $\pm$ 2,29	5,2 $\pm$ 1,65	7,85 $\pm$ 1,05	1,3 $\pm$ 0,32*

*Nem szignifikáns különbség az alapszinthez képest.



2.ábra. A cAMP szint hormonstimulálhatósága vad típusu CBA és CBA nu/nu egerek limfocitáiban.

..... cAMP alapszint; --- +noradrenalin;
-.-.- noradrenalin+regitin; — +izoproterenol;
..... izoproterenol+propranolol

Az ábra egy jellemző kísérlet eredményeit mutatja.

kozott a kontroll és a nude egerekből származó limfociták cAMP szintjének hormonstimulálhatóságában, arra utal, hogy a két limfocita szubpopuláció közül a T limfociták érzékenyebben reagálnak a vizsgált hormonokra. /A migrációval kapcsolatban ezt tisztított T és B sejtpopulációkon nyert adatok is megerősítik./

3.2. Az intracelluláris cAMP szintet befolyásoló alfa- és béta-adrenerg stimulánsok hatása a limfociták spontán migrációjára

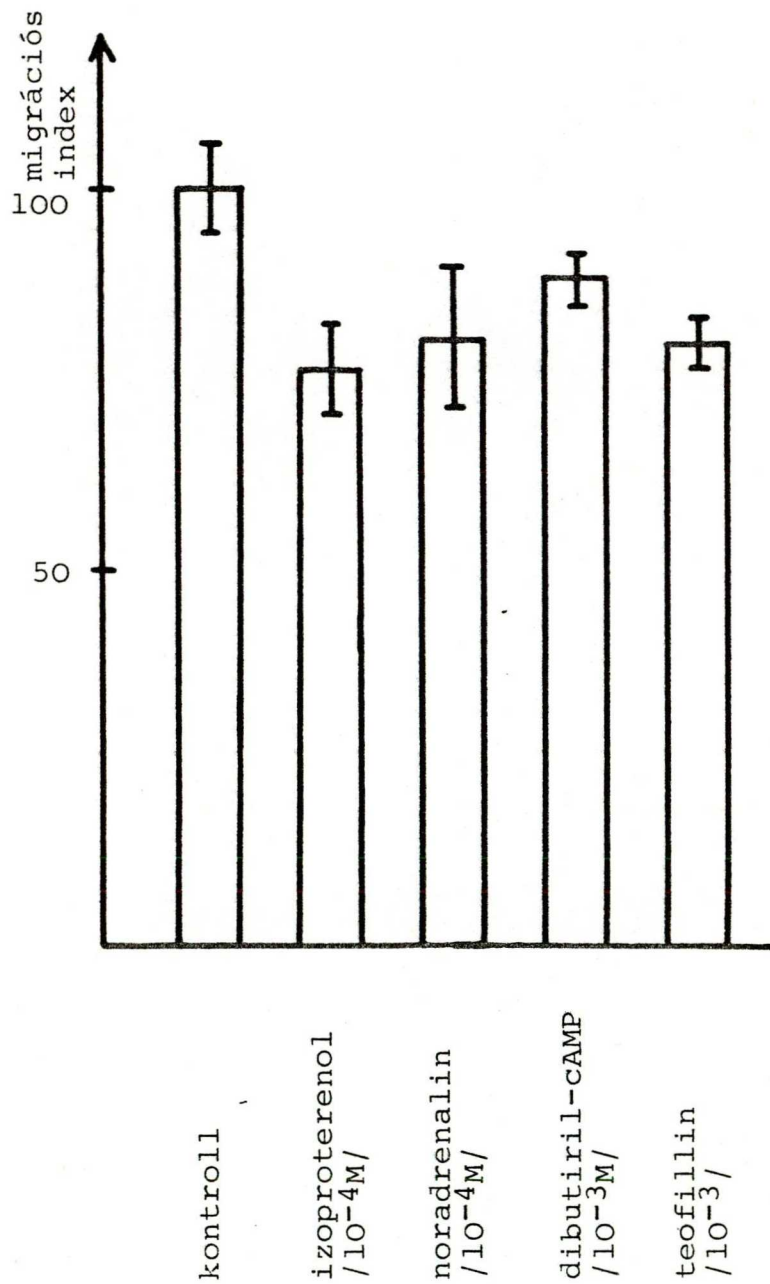
Az irodalmi áttekintésben említett adatok alapján a cAMP a mikrotubulusok képződésében játszott szerepe révén befolyásolhatja a limfociták aktív mozgását. Érdekesnek tűnt annak tanulmányozása, hogy valóban létezik-e direkt összefüggés a cAMP szint és a spontán migráció között.

A sejtek endogén cAMP szintje elsősorban a képződéséért és lebontásáért felelős adenil-cikláz, illetve foszfodieszteráz enzimek aktivitási viszonyának eredménye. Ezért B 10.R III törzsből származó egerek limfocitáin megvizsgáltuk az adenil-cikláz aktivitást növelő noradrenalin és izoproterenol, valamint a foszfodieszteráz gátló teofillin hatását a migrációra. Kisérleteink-

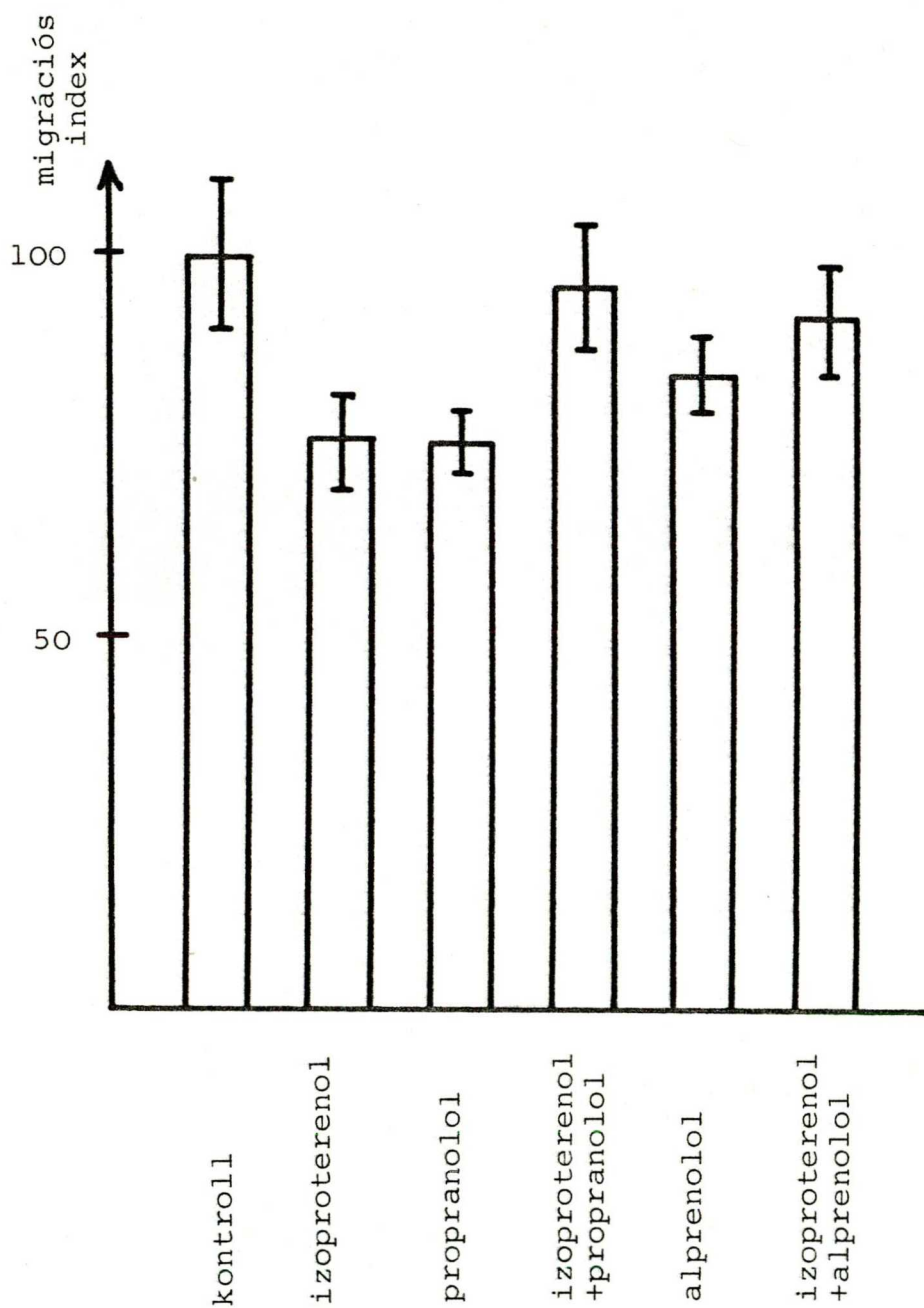
ben mindkét típusu kezelés gátló hatásának bizonyult /3.ábra/, ami összhangban áll azzal, hogy mindkét hatás a cAMP szint emelkedésével jár. Ennek megfelelően a sejtszuszpenzióhoz adott exogén dibutiril-cAMP a sejtek migrációját csökkentette.

Ha béta-receptor blokkoló propranolollal, illetve alfa-receptor blokkoló regitinnel előinkubált sejteken vizsgáltuk a hormonok hatását, azt tapasztaltuk, hogy a propranolol az izoproterenol és a noradrenalin migrációgátló hatását felfüggesztette /4.,5.ábra/, míg a regitin ezt nem befolyásolta. Ez arra utal, hogy ezek a hormonok migrációgátló hatásukat a béta-adrenerg receptorokon keresztül fejtik ki.

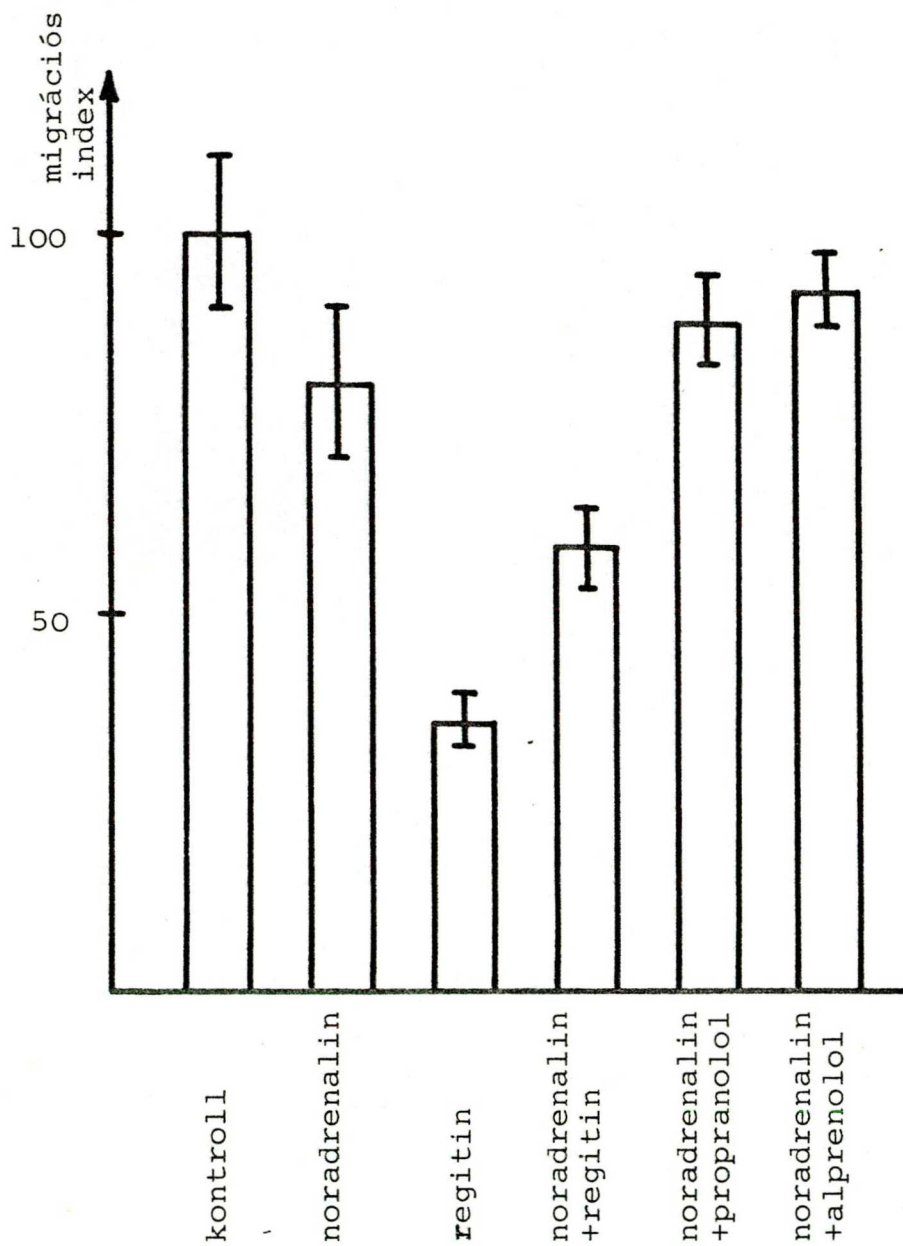
A T és B limfociták hormon-érzékenysége közötti különbséget egyrészt a már leírt CBA-CBA nude rendszeren vizsgáltuk /6.ábra/. Vizsgálataink szerint a vad típusu CBA egértörzsből származó limfocita populációban izoproterenol hatására fokozottabb migrációgátlás mérhető, mint a nude egerekből származó sejtek esetében. Ez valószínűsíti, hogy ezeknek a hormonoknak, illetve hormonanalógoknak a hatására bekövetkező, a sejtek migrációs képességét érintő változás a T sejtek esetében kifejezettebb. Ennek alátámasztására a vizsgálatot szeparált T és B limfocita populációkkal is elvégeztük. Ezekben a kísérletekben szintén a T limfociták fokozottabb reagálása volt megfigyelhető /6.ábra/.



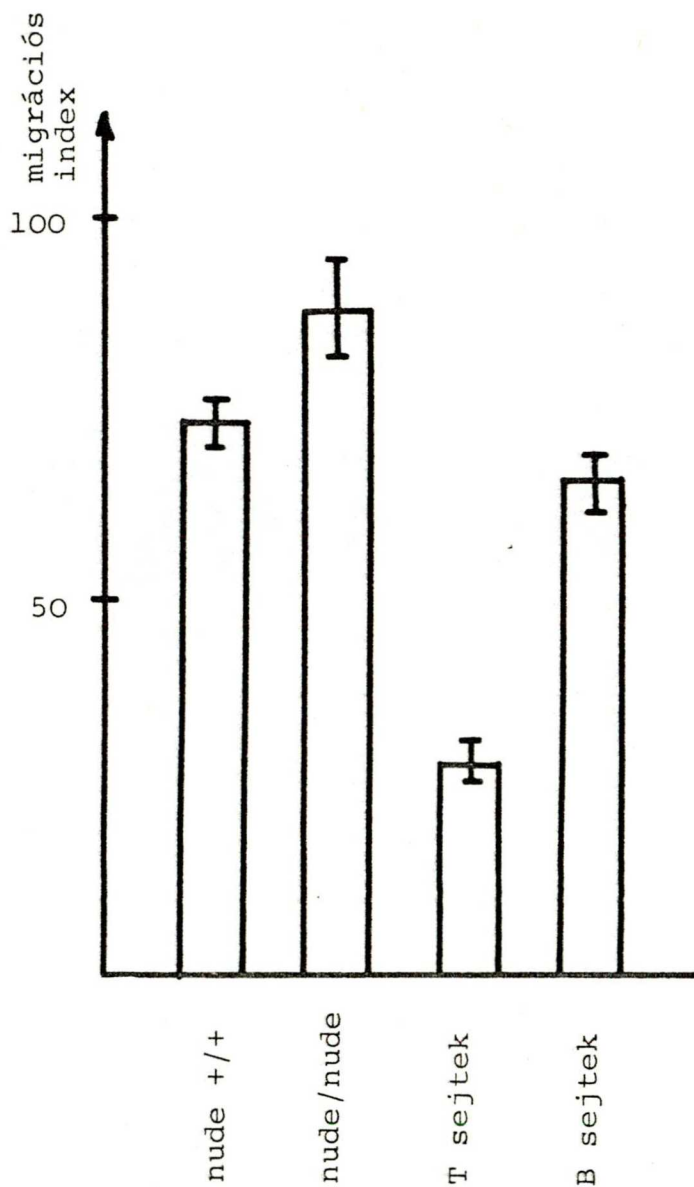
3.ábra. Egér limfociták spontán migrációjának befolyásolhatósága a cAMP rendszeren keresztül ható ágensekkel



4.ábra. A béta-receptor stimuláció szerepe a limfociták spontán migrációjának szabályozásában. A hatóanyagok koncentrációja 10^{-4} M volt.



5. ábra. A noradrenalin migrációgátló hatása alfa- illetve béta-receptor blokkolók jelenlétében. A hatóanyagok koncentrációja 10^{-4} M volt.



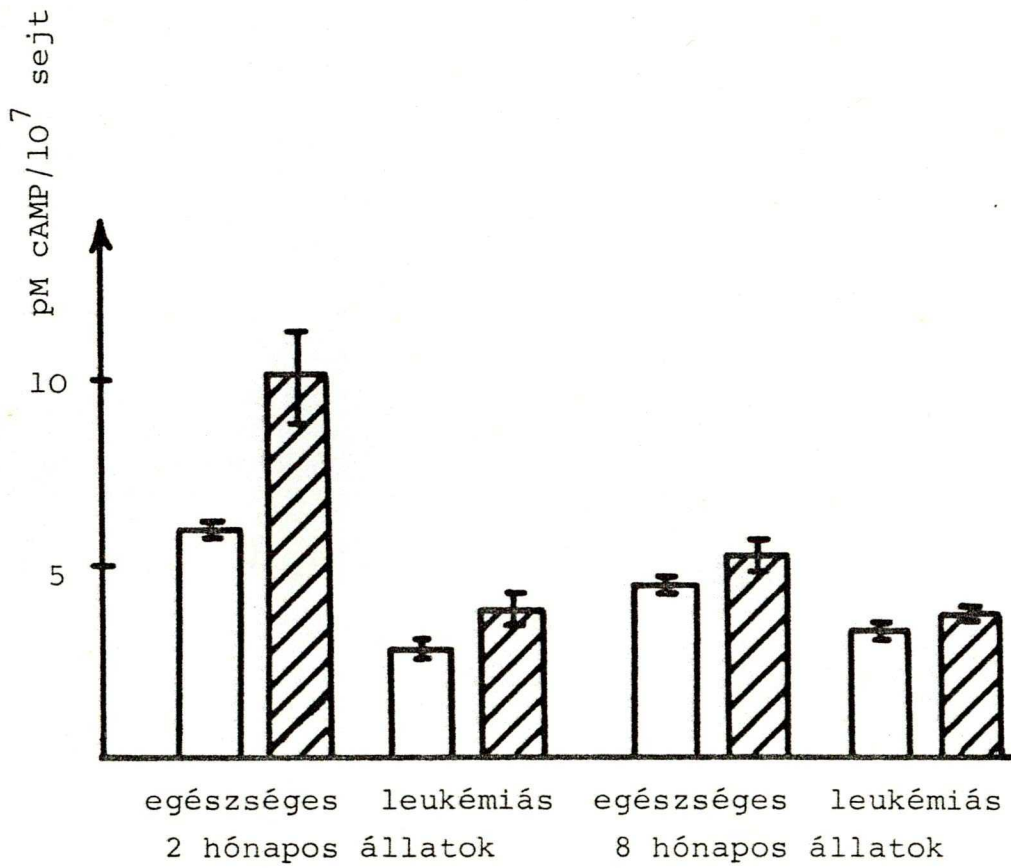
6.ábra. Az izoproterenol különböző mértékű migráció-
-gátló hatása T és B limfocitákon. Az izo-
proterenolt 10^{-4} M /nude +/+; nude/nu/, illetve
 10^{-3} M /T és B sejtek/ koncentrációban alkal-
maztuk.

3.3. Leukémiás egerek limfocitáinak cAMP szintje és migrációja

Az AKR/J egértörzsben a 8-12 hónapos állatokban egy, a timuszból eredő, spontán T-sejtes malignus limfóma fejlődik ki /NOVINSKY és mtsai, 1979/. Így ezekben az állatokban a limfociták tulnyomó része T sejt. Mivel az előző kísérletek arra utaltak, hogy a vizsgált hormonok által előidézett változások elsősorban a T sejtek reakcióinak tulajdoníthatók, érdekesnek tűnt a T-sejtes leukémiás állatok limfocitáinak cAMP szintjét és stimulálhatóságát, valamint migrációját összehasonlítani az egészséges kontrollal.

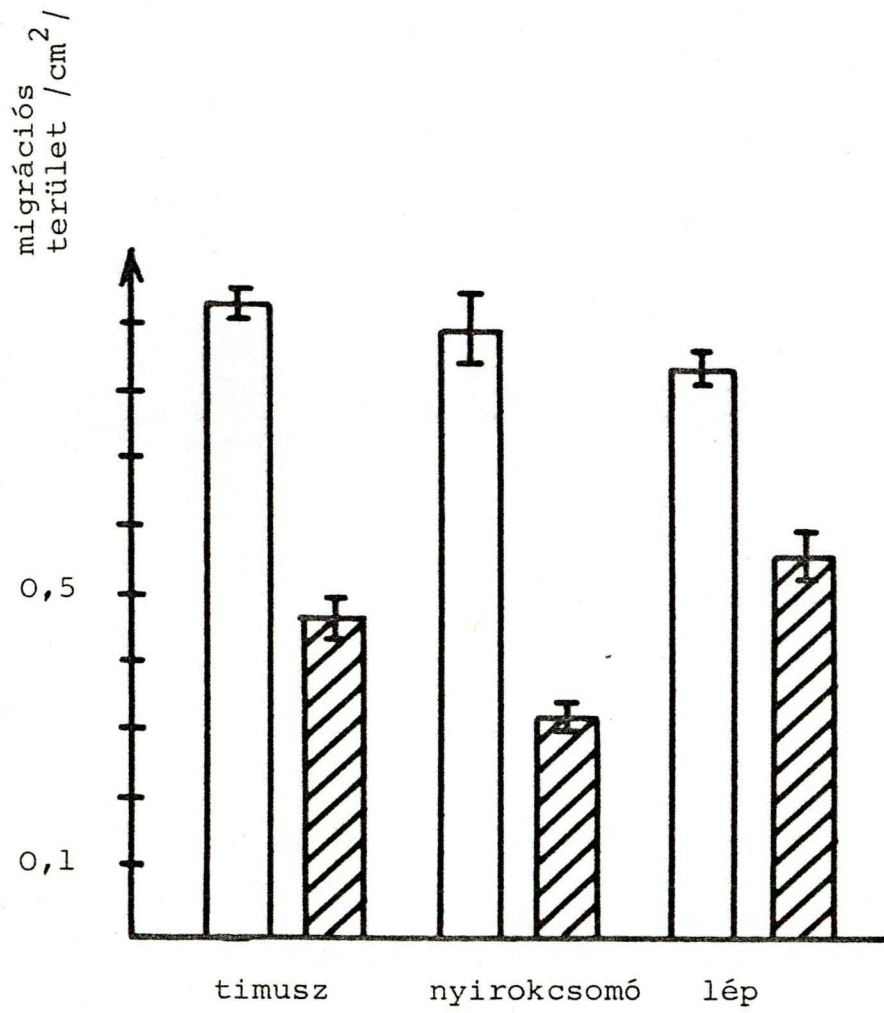
A 7.ábrán különböző koru AKR/J egerek nyirokcsomóból származó limfocitáinak cAMP alapszintjét és a cAMP szint stimulálhatóságát ábrázoltuk. Látható, hogy a fiatal, egészséges állatok limfocitáinak cAMP szintje és stimulálhatósága a korral, illetve a leukémia kifejlődésével párhuzamosan csökken.

Csökkent spontán migrációt mutatnak a leukémiás állatok lépből, nyirokcsomóból és timuszból származó limfocitái az egészséges kontrollhoz képest /8.ábra/. Mivel ez ellentmondott az eddigi eredményeknek /az alacsony cAMP szint serkenti a migrációt/, arra kerestünk választ, hogy ez a rendellenesség a leukémiás állatokból



7.ábra. A cAMP-szint stimulálhatósága különböző koru AKR/J egerek limfocitáiban

- cAMP alapszint
▨ 5x10⁻⁵M izoproterenollal stimulált érték



8.ábra. Azonos koru /8-9 hónapos/ AKR/J egerek limfocitáinak spontán migrációja

- ☐ egészséges állatok
☒ leukémiás állatok

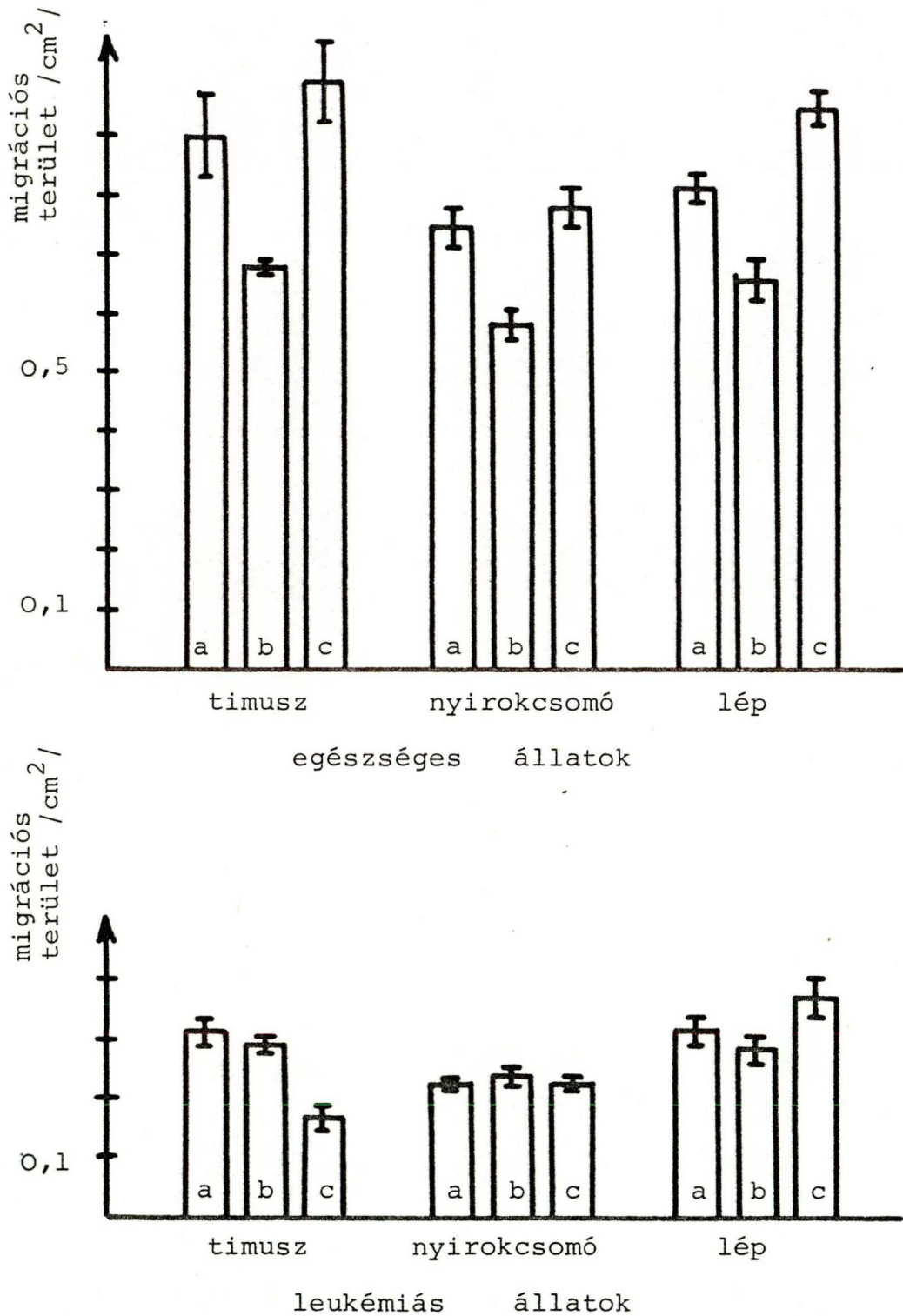
izolált sejtek receptor-működésének, vagy mikrotubuláris rendszerének megváltozásával függ-e össze. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk a béta-receptor stimuláló izoproterenolnak és a mikrotubulus képződést gátló kolhicinnek a migrációra gyakorolt hatását /9.ábra/.

Az egészséges kontroll limfocitákban - a más törzsből származó egerekének megfelelően - az izoproterenol gátolja a spontán migrációt, míg a leukémiás sejteknél nincs gátló hatása. Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy ez a hormon a leukémiás sejtek cAMP szintjét sem változtatta meg. Annak ismeretében, hogy a sejtek rosszindulatú transzformációja a sejtmembrán molekuláris szerkezetének megváltozásával jár együtt, elképzelhető, hogy ezek a változások a receptorok működésére is kihatnak.

A kolhicin egészséges limfocitákon fokozza a spontán migrációt, leukémiás eredetű limfocitáknál azonban nem befolyásolja számottevően /nyirokcsomó, lép/, illetve gátolta /timusz/ azt. Mivel ismeretes, hogy a transzformálódott sejtek gyakran dezorganizált mikrotubulus-rendszerrel rendelkeznek, lehetséges, hogy a kolhicin-hatás hiánya ennek a következménye.

3.4. A cAMP szint regulációjának genetikai vonatkozásai

Az intracelluláris cAMP szint szabályozása rendkívül komplex folyamat, ezért várható, hogy ezt genetikai



9.ábra. Izoproterenol és kolhicin hatása AKR/J egerek limfocitáinak spontán migrációjára

- a. spontán migráció
- b. +izoproterenol
- c. +kolhicin



tényezők is komolyan befolyásolják.

Annak megállapítása céljából, hogy milyen kapcsolat áll fenn a sejtek cAMP alapszintje, illetve ennek hormonstimulálhatósága, valamint a genetikai állomány között, összehasonlító vizsgálatokat végeztünk különböző genetikai háttérű beltenyésztett egereken.

Tekintettel arra, hogy egyes immunreakciók szabályozásában a H-2 régió meghatározó szerepet játszik, külön figyelmet fordítottunk a H-2 régióban lévő különbségekre. A vizsgálatokhoz azonos genetikai alapu, de a H-2 régióban eltérő egértörzseken vizsgáltuk a cAMP szintet és annak változását béta-receptor stimulálók hatására. A vizsgált négy egértörzs H-2 haplotípusát és genetikai háttérét a 3.táblázatban foglaltam össze.

3.táblázat. A vizsgált egértörzsek genetikai jellemzői

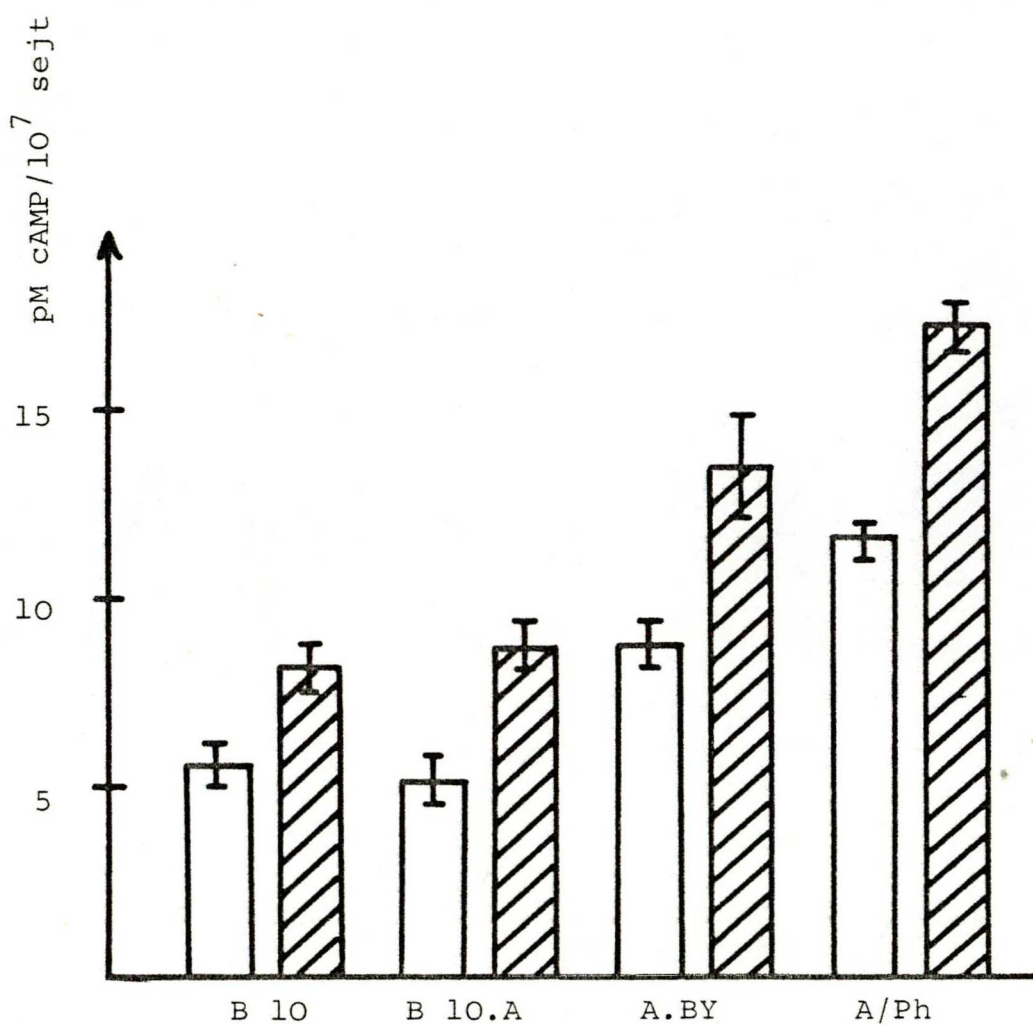
	H-2 haplotípus	
	b	a
B 10:	B 10	B 10.A
Genetikai háttér		
A:	A.BY	A/Ph

A táblázatból látható, hogy a kiválasztott egértörzsek közül 2-2-nek a H-2 génkomplexe, illetve a ge-

netikai háttere /H-2 régióon kívüli rész/ egyezik meg.

A kísérletek azt mutatták, hogy az A alapu egerek cAMP szintje a B 10 alapuakéhoz viszonyítva magasabb volt, ami arra utal, hogy a genetikai háttér befolyásolja a cAMP alapszintet /10.ábra/. Másrészt az azonos A alapu, csak a H-2 régióban különböző törzsek cAMP szintje is szignifikáns különbséget mutatott. Bár ilyen különbség a B 10 genetikai háttér mellett nem volt megfigyelhető, elképzelhetőnek tűnik, hogy a H-2 régió génjei is befolyásolják a cAMP szintet, bár kisebb mértékben.

A kapott eredményekből egyértelműen megállapítható volt, hogy az alapszintben mutatkozó különbségek a hormonstimulálhatóság %-os mértékét nem befolyásolták, ez mind a négy vizsgált törzsben azonosnak adódott.



10.ábra. A limfociták cAMP alapszintje és stimulálhatósága különböző genetikai háttérű és H-2 haplotípusú egértörzsekben

- ☐ cAMP alapszint
- ☒ 5×10^{-5} M izoproterenollal stimulált érték

4. MEGVITATÁS

4.1. A sejtfelszíni receptorok szerepe a cAMP szint hormonstimulálhatóságában

A kísérleti eredmények - az irodalmi adatoknak megfelelően /BACH, 1975; WELSCHER és CRUCHAUD, 1978/ azt mutatják, hogy az izoproterenol és a noradrenalin a limfociták intracelluláris cAMP szintjét a sejtfelszíni béta-adrenerg receptorok közvetítésével befolyásolja. Erre utal, hogy a béta-receptorok blokkolása a stimulációt megszüntette, ugyanakkor az alfa-receptor blokkoló szerek a hormonhatással nem interferáltak.

A limfociták cAMP szintjének hormonstimulálhatósága a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan kisebbnek bizonyult a nude /timuszhiányos/ egerekből származó vizsgálati anyagon. Annak tisztázására, hogy ez a különbség a szervezet sejtjeire nézve általános, a mutáció által befolyásolt béta-receptor változásból adódik-e, ERDEI J. és mtsai /nem közölt adat/ összehasonlították nude és vad /CBA +/+/ egerekből származó limfociták, illetve májsejtek membránjának adenil-cikláz aktivitását. Eredményeik azt mutatták, hogy a kérdéses különbség csak a limfociták esetében tapasztalható. Mivel a nude egerekben a két fő limfocita szubpopulációból a B sejtek domi-

nálóak /kb. 95%/, valószínűsíthető volt, hogy a két törzs között a stimulálhatóságban mutatkozó különbség a T és B sejtek eltérő arányából ered. Ez azt jelentené, hogy a T sejtek a vizsgált hormonokkal fokozottabban stimulálhatók, NIAUDET és mtsai /1979/ valóban ilyen eredményt kaptak emberi eredetű tisztított T és B limfocitákkal végzett kísérleteik során. Saját - egér limfocitákkal végzett - hasonló kísérleteink is ezt az elképzelést erősítik meg.

4.2. Az intracelluláris cAMP szint és a limfociták spontán migrációja közti korreláció

Mivel irodalmi adatok szerint a cAMP befolyásolja a limfociták aktív mozgását /PICK, 1972; PICK és MANHEIMER, 1974; SCHREINER és UNANUE, 1975/ a cAMP alapszint és stimulálhatóságának ismeretében vizsgáltuk az előzőekben tesztelt hormonoknak a spontán migrációra gyakorolt hatását. A noradrenalin és az izoproterenol egyaránt gátolta a spontán migrációt, s ez a hatás - hasonlóan a más kísérleti rendszerekben kapott eredményekhez /ISHIZUKA és mtsai, 1970; MAKMAN, 1971; NIAUDET és mtsai, 1976/ - szintén béta-receptor specifikus volt.

Más irányú kísérleteink eredményeiből kitűnik, hogy a sejtek endogén cAMP szintje a vizsgált hormonok

hatására erősen megnövekedett. Feltehető volt, hogy ez a magasabb cAMP szint csökkentette - az irodalmi adatoknak megfelelően - a limfociták motilitását. Ennek ellenőrzése céljából megmértük, miként változtatja meg a sejtek migrációját a kísérleti rendszerhez adott cAMP. Tekintettel arra, hogy a cAMP-t a sejtek nehezen veszik fel, és hogy a foszfodieszteráz hatás következtében a sejten belüli féléletideje igen rövid /GAIL, 1973/, gyakorlati okokból kísérleteinket egy szubsztituált származékával, a dibutiril-cAMP-vel végeztük. A rendszerhez adott exogén dibutiril-cAMP-vel a migráció-gátlás jól reprodukálható volt. A kívülről alkalmazott magas koncentrációk $/10^{-3}-10^{-2}$ M/ intracelluláris hatása RASMUSSEN és TENENHOUSE /1970/ adatai szerint a fiziológias értékeknek felel meg.

A timuszhiányos, nude egerekből preparált limfociták /kb. 95%-ban B sejtek/ migrációja izoproterenollal kevésbé befolyásolható. Feltételezhető volt, hogy a cAMP szint stimulálhatóságában mutatkozó különbséghez hasonlóan, ez a hatás is a T sejtek hiányával magyarázható. Ezt megerősíteni látszanak szeparált T és B sejteken végzett kísérleteink eredményei. Ezek szerint a T sejtek migrációjának hormonérzékenysége - a cAMP szint fokozottabb stimulálhatóságának megfelelően - nagyobb mértékű. Ez összefügghet

azzal, hogy a T limfociták felszínén több béta-receptor található /KATELEY és mtsai, 1975; NIAUDET és mtsai, 1976/.

4.3. A limfómás állatokból származó limfociták anomális viselkedése

Kísérleti munkánk során a T és B limfociták közti különbségek vizsgálatát nagymértékben segítette a gyakorlatilag csak B limfocitákkal rendelkező nude egerek felhasználása. Hasonló lehetőséget reméltünk az AKR/J törzs esetében, ahol a spontán limfóma kifejlődése után a limfocita preparátumokban túlnyomóan T sejtekkel számolhattunk. Ilyen kísérleti anyaggal a CBA nude - CBA +/+ rendszeren kapott eredményeink másik oldalról is ellenőrizhetővé válnak. Ahhoz, hogy ez a megközelítés eredményes lehessen, ellenőriznünk kellett, hogy az egészséges illetve limfómás állatokból izolált T limfociták azonos reakciókat mutatnak-e.

Kísérleteink egyértelműen azt mutatták, hogy az AKR/J törzs T sejtjei a limfóma kialakulása során olyan változásokon mennek keresztül, melyek következtében rendhagyó reakciókat mutatnak. A hormon-stimuláció cAMP szintjüket alig befolyásolja, és ennek megfelelően a migrációs képességet is alig változtatja meg. A limfómás

állatokból izolált T sejtek csökkent migrációs képessége nem felel meg az abszolút értékben alacsony cAMP szint alapján várható értéknek. Ezek az ellentmondások valószínűleg annak a következményei, hogy a T limfociták rosszindulatu transzformációja során létrejött mélyreható anyagcsere-biokémiai változások /WARBURG, 1956/ a sejtek fiziológiai és szerkezeti viszonyait olyan mélyrehatóan változtatják meg, hogy a transzformált limfociták reakcióit az általunk alkalmazott egyszerű kísérleti modell segítségével már nem lehet vizsgálni.

4.4. A sejtek cAMP alapszintjének és a stimulálhatóság mértékének genetikai determináltsága

Többben végeztek kísérleteket egér májsejtekkel annak meghatározására, hogy a genom tényezői miként befolyásolják a sejtek cAMP alapszintjének kialakulását. Metodikai okokból külön vizsgálták a H-2 régió génjeinek hatását, míg a genom többi részét egyszerűen mint "háttér" vették figyelembe. Eredményeik alapján MERUELO és EDIDIN /1975/ arra a következtetésre jutott, hogy a cAMP alapszint kialakítását az un. háttér génjei lényegesen nem befolyásolják, azt alapvetően a H-2 régió határozza meg. LAFUSE és mtsai /1979/ legalább két H-2 gén szerepét hangsúlyozzák, ugyanakkor legalább egy háttérgén befolyását is fontosnak tartják.



Az említett dolgozatokban leírtakhoz hasonló kísérletes megközelítés mellett limfocitákkal végzett saját kísérleteink azt mutatták, hogy a fenti értelemben vett genetikai háttér egyértelműen fontos tényező a cAMP alapszint kialakításában. Meggondolva, hogy a háttér ilyen fogalma a H-2 régió kivételével a teljes genomot magában foglalja /beleértve a cAMP metabolizmusához kapcsolódó valamennyi enzim génjeit is/, várható, hogy a háttér megváltozása - ami igen sok gént érinthet - befolyásolja a cAMP szintet, mivel az a metabolizmus enzimreakcióinak egyensúlyából adódik /APPFEL, 1976/. A kísérletek eredményei eszerint azt tükröznék, hogy a cAMP alapszintet befolyásoló számos tényező hatása összegződik vagy kompenzálja egymást, és ezáltal okoz-e mérhető változást.

Az un. genetikai háttérhez képest viszonylag jól definiálható kromoszóma-szakasz a H-2 régió. Eredményeink szerint két, több génben eltérő H-2 haplotípus azonos A genetikai háttér mellett a limfocitákban szignifikánsan különböző cAMP szintet eredményezett. A B 10 genetikai háttér mellett azonban ez a hatás nem mutatkozott. Mivel mindkét esetben ugyanazt a két H-2 haplotípust vizsgáltuk, és mivel az A háttér esetében megfigyelt változás minden valószínűség szerint ezek különbségéből ered, fel-

tételezzük, hogy a H-2 régió egyes génjei befolyásolhatják a cAMP alapszintet, de ennek mérhetősége függ a háttér tényezőinek hatásától, valószínűleg oly módon, hogy ez a hatás mértékében az utóbbiakkal összemérhető erősségű, vagy azoknál lényegesen gyengébb.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során ismert genetikai háttérű limfocita populációkban korrelációt mutattunk ki a béta-adrenerg stimulánsok jelenléte és az intracelluláris cAMP koncentráció között. A stimulálhatóság mértéke a limfociták két fő szubpopulációja /T és B sejtek/ közül a T sejtekben lényegesen nagyobbak bizonyult.

A limfociták fiziológiai folyamatai közül a spontán migráció szabályozásában közvetlenül is kimutattuk a vizsgált hormonok hatását. A cAMP szint és a spontán migráció hormonhatásra bekövetkező változásának fokozatos csökkenése figyelhető meg - a limfociták élettani elváltozásával párhuzamosan - limfómás leukémia kialakulása során.

Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a cAMP szintet meghatározó genom-tényezők hatását a H-2 hisztokompatibilitási régió bizonyos génjei is befolyásolhatják.

Dolgozatom részben kiegészíti az irodalmi adatokat, másrészt az eddigi, különböző szervezetekkel végzett és egy-egy részletre koncentráló munkánkkal szemben a témakör komplexebb elemzését adja.

IRODALOMJEGYZÉK

- ABELL, C.W., MONACHAN, T.M. /1973/ The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division.
J.Cell.Biol. 59, 549-555.
- ALLISON, A.C., DAVIES, P., de PETRIS, S. /1971/ Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis.
Nature New Biol. 232, 153-155.
- APFFEL, C.A. /1976/ Nonimmunological host defences: A Review Cancer Res. 36, 1527-1537.
- BACH, M.A. /1975/ Differences in cyclic AMP changes after stimulation by prostaglandins and isoproterenol in lymphocyte subpopulations.
J.Clin.Invest. 55, 1074-1081.
- BENACERRAF, B., KATZ, D.H. /1975/ The histocompatibility-linked immune response genes.
Adv.Cancer Res. 21, 121-128.
- BHISHEY, A.N., FREED, J.J. /1971/ Ameboid movement induced in cultured macrophages by colchicin or vinblastin.
Exp.Cell.Res. 64, 419-429.



BOURNE, H.R., LICHTENSTEIN, L.M., MELMON, K.L. /1972/

Pharmacologic control of allergic histamine release in vitro: Evidence for an inhibitory role of 3',5'-adenosine monophosphate in human leucocytes. J.Immunol. 108, 695-705.

BURLESON, D.G., SAGE, H.J. /1976/ Effect of lectins on

the levels of cAMP and cGMP in guinea pig lymphocytes: Early responses of lymph node cells to mitogenic and non-mitogenic lectins. J.Immunol. 116, 696-703.

BUSSOLINO, F., BENVENISTE, J. /1980/ Pharmacological modulation of platelet-activating factor /PAF/ release from rabbit leucocytes. I. Role of cAMP. Immunology 40, 367-375.

BUTCHER, R.W., ROBISON, G.A., SUTHERLAND, E.W. /1972/

Cyclic AMP and hormone action. In "Biochemical actions of hormones" /Litwack G., ed./, Academic Press, New York.

FRIEDMAN, H., SANZ, M., COMBE, C., MILLS, L., LEE, Y. /1969/

Migration of mouse lymphocytes in vitro from capillary tube cultures. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 132, 849-854.

- GAIL,M. /1973/ Time lapse studies on the motility of fibroblaste in tissue culture. In "Locomotion of tissue cells, CIBA Found.Symp." Ser. 14, Elsevier, Amsterdam.
- HADDEN,J.W., HADDEN,E.M., HADDOX,M.K., GOLDBERG,N.D. /1972/ Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 3024-3027.
- HENNEY,C.S., BOURNE,H.R., LICHTENSTEIN,L.M. /1972/ The role of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes. J.Immunol. 108, 1526-1534.
- HIGGINS,T.J., DAVID,J.R. /1976/ Effect of isoproterenol and aminophylline on cyclic AMP levels of guinea pig macrophages. Cell.Immunol. 27, 1-10.
- HIGGINS,T.J., WINSTON,C.T., DAVID,J.R. /1976/ Effect of migration inhibitory factor /MIF/ on cyclic AMP levels of guinea pig macrophages. Cell.Immunol. 27, 11-16.
- ISHIZUKA,M., GAFNI,M., BRAUN,W. /1970/ Cyclic AMP effects on antibody formation and their similarities to hormone-mediated events. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134, 963-967.

- JULIUS, M.H., SIMPSON, E., HERZENBERG, L.A. /1973/ A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur.J.Immunol. 3, 645-649.
- KATELEY, J.R., KASAROV, L., FRIEDMAN, H. /1975/ Elevated cyclic AMP levels in mouse lymphoid tissue after stimulation by cholera enterotoxin in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 148, 19-24.
- KOOPMAN, W.J., GILLIS, M.H., DAVID, J.R. /1973/ Prevention of MIF activity by agents known to increase cellular cyclic AMP. J.Immunol. 110, 1609-1614.
- LAFUSE, W., MERUELO, D., EDIDIN, M. /1979/ The genetic control of liver cAMP levels in mice. Immunogenetics 9, 57-65.
- MAKMAN, M.H. /1971/ Properties of adenylate cyclase of lymphoid cells. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 68, 885-889.
- MERUELO, D., EDIDIN, M. /1975/ Association of mouse liver adenosine 3',5'-cyclic monophosphate /cyclic AMP/ levels with Histocompatibility-2 genotype. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 2644-2648.

- NIAUDET,P., BEAURAIN,G., BACH,M.A. /1976/ Differences in effect of isoproterenol stimulation on levels of cyclic AMP in human B and T lymphocytes. Eur.J.Immunol. 6, 834-836.
- NOVINSKY,R.C., BROWN,M., DOYLE,T., PRENTICE,R.L. /1979/ Genetic and viral factors influencing the development of spontaneous leukemia in AKR mice. Virology 96, 186-204.
- OKUMURA,K., HERZENBERG,L.A., MURPHY,D.B., McDEVITT,H.O., HERZENBERG,L.A. /1976/ Selective expression of H-2 /I-region/ loci controlling determinants on helper and supressor T lymphocytes. J.Exp.Med. 144, 685-698.
- PASTAN,I.H., JOHNSON,G.S., ANDERSON,W.B. /1975/ Role of cyclic nucleotides in growth control. Ann.Rev.Biochem. 44, 491-522.
- PICK,E. /1972/ Cyclic AMP affects macrophage migration. Nature New Biol. 238, 176-177.
- PICK,E., MANHEIMER,S. /1973/ The mechanism of action macrophage inhibitory factor. Int.Arch.Allergy 45, 295-298.
- PICK,E., MANHEIMER,S. /1974/ The mechanism of action of soluble lymphocytic mediators II. Modification of macrophage migration and migration inhibitory factor action by drugs, enzymes and cationic environment. Cell.Immunol. 11, 30-46.



- POLGÁR,P., VERA,J.C., RUTENBURG,A.M. /1977/ An altered response to cyclic AMP stimulating hormones in intact human leukemic lymphocytes.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 154, 493-495.
- RASMUSSEN,H., TENENHOUSE,A. /1970/ Parathyroid hormone and calcitonin. In "Biochemical actions of hormones" /Litwack,G., ed./, Academic Press, New York.
- REIF,A.E., ALLEN,J.M. /1966/ Mouse thymic iso-antigens.
Nature, 209, 521-523.
- SCHER,N.S., QUAGLIATA,F., MALATHI,V.G., FAIG,D., MELTON,R.A., SILBER,R. /1976/ Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in normal and cronic lymphocytic leukemia lymphocytes.
Cancer Res. 36, 3958-3962.
- SCHREINER,G.F., UNANUE,E.R. /1975/ The modulation of spontaneous and anti-Ig-stimulated motility of lymphocytes by cyclic nucleotides and adrenergic and cholinergic agents.
J.Immunol. 114, 802-808.

SCHULTER,J., GRATZNER,H.G. /1973/ The role of cyclic nucleotides in carcinogenesis. In "Miami Winter Symposia", vol. 6, Academic Press, New York.

SHREFFLER,D.C., DAVID,C.S. /1975/ The H-2 major histocompatibility complex and the immune response region: genetic variation, function and organization.
Adv.Immunol. 20, 125-195.

SKELLY,R.R., STEINBERG,A.D., PLESCIA,O.J. /1978/ Regulation of antigen induced changes in cyclic nucleotide levels in NZB/WF mice.
Cell.Immunol. 36, 283-293.

STEINER,A.L., PAGLIARA,A.S., CHASE,L.R., KIPNIS,D.M.
/1972/ Radioimmunoassay for cyclic nucleotides II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids.
J.Biol.Chem. 247, 1114-1120.

SUTHERLAND,E.W., RALL,T.W. /1960/ The relation of adenosine 3',5'-phosphate and phosphorilase to the actions of catecholamines and other hormones.
Pharmacol.Rev. 12, 265-292.

TOVEY, K.C., OLDHAM, K.G., WHELAN, J.A.M. /1974/ A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding assay.

Clin.Chim.Acta, 56, 221-234.

YAMAMOTO, I., WEBB, D.R. /1975/ Antigen-stimulated changes in cyclic nucleotide levels in the mouse.

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 2320-2324.

VISCHER, T.L. /1976/ The differential effect of cyclic AMP on lymphocyte stimulation by T- or B-cell mitogens.

Immunology, 30, 735-739.

WARBURG, O. /1956/ On the origin of cancer cells.

Science, 123, 309-314.

WELSCHER, H.D., CRUCHAUD, A. /1978/ Conditions for maximal synthesis of cyclic AMP by mouse macrophages in response to β -adrenergic stimulation.

Eur.J.Immunol. 8, 180-184.