

HUMÁN INTERFERON-GAMMA TERMELÉSE, TISZTÍTÁSA

ÉS JELLEMZÉSE

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

ENDRÉSZ VALÉRIA

1993



TARTALOM

	OLDAL
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	1
1. Az interferon fogalma és az interferonok osztályozása	1
2. Az interferon-gének	3
3. Az interferonok indukciója és az interferon-inducerek	4
3.1. Az IFN-alfa és IFN-béta indukciója	4
3.2. AZ IFN-gamma inducerei	6
4. Az interferonok receptorai	11
5. Az interferonok hatásai	13
5.1. Az interferonok hatásmechanizmusa	14
5.2. Az interferonok antimicrobiális hatásai	18
5.3. Az interferonok antiproliferatív hatása	22
5.4. Az interferonok sejtfelszíni molekulákra kifejtett hatása	24
5.5. Az interferonok hatása az antigénspecifikus és a nem antigénspecifikus immunfolyamatok effektor-sejtjeire	26
5.6. Az interferonok "priming" hatása	28
6. Az interferonok termelése és tisztítása	29
7. Az interferonok alkalmazása a humán terápiában	32
AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSE	38
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	40
1. Anyagok	40
2. Szérumok	41

3. Sejtek	41
3.1. Humán fehérvérsejtek izolálása	41
3.1.1. A mononukleáris sejtek	41
3.1.2. Az NH_4Cl -kezelt leukocyták	41
3.2. Sejtkultúrák	42
4. Vírusok	42
4.1. VSV	42
4.2. Sendai vírus	43
5. Az interferonok termelése	43
5.1. A humán IFN-alfa termelése	43
5.2. A humán IFN-gamma termelése	44
6. Az IFN-gamma tisztítása	45
6.1. CPG-kromatográfia	45
6.2. Gélszűrés Sephacryl S-200 géllal	45
6.3. Gélszűrés Ultrogel AcA 54 géllal	46
6.4. Az interferonok koncentrációja	46
7. Az interferonok jellemzése	46
7.1. PH-érzékenység vizsgálata	46
7.2. Az antivirális aktivitás meghatározása	46
7.3. Az interferonok anticelluláris hatásának vizsgálata	48
7.4. Az interferonok NK és ADCC aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata	48
7.5. Az interferonok "priming" hatásának vizsgálata	49
8. Fehérjetartalom-meghatározás	49
9. Az eredmények értékelése	50

	OLDAL
EREDMÉNYEK	51
1. Az IFN-gamma termelése	51
1.1. Különféle inducerek kipróbálása	51
1.2. Az IFN-gamma azonosítása	52
1.3. Az IFN-alfával előkezelt leukocyták Con A-val indukált IFN-gamma termelésének optimalizálása	52
1.4. A nagybani IFN-gamma termelés optimalizálása	54
2. IFN-gamma termelése IFN-alfát már termelt sejtek szuszpenziójában	56
3. Az IFN-gamma tisztítása	62
4. Az IFN-gamma biológiai aktivitásai	64
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	67
ÖSSZEFOGLALÁS	74
ÁBRÁK	
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	
A TÉMAKÖRREL KAPCSOLATOS SAJÁT KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK, SZABADALMAK	
IRODALOM	i

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. Az interferon fogalma és az interferonok osztályozása

Az interferon (IFN) fehérjetermészetű anyag, amely a szervezet természetes védekező rendszerének része. A szervezet sejtjei IFN-termeléssel reagálnak különféle hatásokra. IFN kiválasztását stimulálják vírusok, baktériumok, idegen sejtek, idegen makromolekulák és számos egyéb vegyület. Az interferonok nem direkt módon fejtik ki hatásukat, hanem a sejteket készítetik újabb fehérjék szintézisére, amelyek befolyásolják a vírusszaporodást, az immunrendszer működését, a sejtek szaporodását és egyéb sejtfunkciókat.

Az interferonok a sejtek között jelátvivő szerepet töltenek be, egy szabályozó, ún. cytokin hálózathoz tartoznak. A cytokin hálózat physiológias feladata, hogy a szervezet sejtjeinek működését, differenciálódását és szaporodását szabályozza, és fertőzés-kor a szervezet védekezésének aktív résztvevőjévé válik. A hálózatot alkotó cytokineket lymphokineknek hívják, ha lymphocyták, monokineknek, ha monocyták és macrophagok termelik. Egyes cytokineket interleukinoknak is neveznek, amelyek a leukocyták közötti jelátvivő anyagok, és az immun- és gyulladásos folyamatok mediátorai. Eszerint az interferonok is cytokinek. A többi cytokintól elkülönítő, az interferonokat jellemző legfontosabb tulajdonság a jelentős széles spektrumú antivirális hatás. Ezt a hatást az interferon specifikus, nagy affinitású receptorhoz való kapcsolódást követően fejt ki (Baron és Dianzani, 1972, Stewart, 1980).

Az interferon rendszer három típusba sorolható molekulák családjába: a leukocyták, vagy IFN-alfa, a fibroblasztok, vagy IFN-béta és az immun-, vagy IFN-gamma (Pestka és Baron, 1980). Ezek a típusok termelődésük módjában, antigenitásukban és egyes fizikokémiai tulajdonságaikban térnek el egymástól.

A leukocyták IFN (IFN-alfa) termelésére tulajdonképpen valamennyi maggal bíró sejt képes, így az immunrendszer sejtjei is (De Maeyer, 1987). Fő forrásai ennek az IFN-típusnak a B lymphocyták, a T lymphocyták és a macrophagok. Nagyon sokféle ágens szerepel IFN-alfa inducerként, így a vírusok, polinukleotidok, endotoxinok, idegen sejtek, vírussal fertőzött sejtek, tumorsejtek és a baktériumok közül elsősorban intracellulárisan szaporodók.

Az IFN-alfa nem egyetlen fehérje, hanem olyan molekulák keveréke, amelyek egy, vagy néhány aminosavban különböznek egymástól. Több, mint 25 szerkezetükben hasonló proteint, vagy glycoproteint tartalmaz (Zoon, 1992). A korábban IFN-alfa családba sorolt IFN-alfa_{II}-t Adolf (1987) javaslata alapján, eltérő antigenitása miatt külön IFN családnak tekintik, és IFN-omegának nevezik.

A fibroblaszt IFN (IFN-béta) termelésére az IFN-alfához hasonlóan mindenféle sejt képes, a fő sejttípusok, amelyekben képződik a fibroblasztok, epitélisejtek, myeloblasztok és lymphoblasztok. Inducerei a vírusok, polinukleotidok, az RNS- és fehérjeszintézist gátló anyagok. Az IFN-alfától eltérően egyféle IFN-béta molekula ismeretes.

Az immun-IFN (IFN-gamma) termelése az antigén által aktivált T sejtek speciális funkciója. Antigének és T sejt mitogének idézik

elő termelését. Az NK sejtek, azaz az LGL sejtek (Djeu és mtsai, 1982, Young és Hardy, 1990) is termelnek IFN-gammát.

Az IFN-alfát és bétát I-típusú interferonokként is emlegetik, mivel sok közös biológiai aktivitással és fizikokémiai tulajdonsággal bírnak, míg az IFN-gammát II-típusú interferonnak is nevezik.

2. Az interferon-gének

Az 1980-ban történt első klónozásuk óta (Nagata és mtsai, 1980) sok humán leukocyta IFN gént klónoztak és jellemeztek restrikciós térképük, nukleotid szekvenciájuk és kromoszómalokációjuk alapján.

A humán IFN-alfa géncsalád 14 nem allelikus génből és 4 pszeudogénből áll (Henco, 1985), és a 9-es kromoszómán helyezkedik el (Owerbach és mtsai, 1981; Slate, 1982). Az IFN-omega génje 70% homológiát mutat az IFN-alfa génekkel (Hauptman, 1985). Az IFN-bétát egyetlen gén kódolja szintén a 9-es kromoszómán, kb. 45% homológiát mutat nukleotid szinten a humán IFN-alfa génekkel (Taniguchi és mtsai, 1980). Az IFN-alfa, béta és omega génekre jellemző, hogy intront nem tartalmaznak. Általában az IFN-alfa gének nem kódolnak N-glykozilációs helyet (Pestka, 1983), míg az IFN-béta és az IFN-omega 1 génje hordoz N-glykozilációs helyet. A humán IFN-alfa és béta gének egy 189 aminosavból álló prefehérjét kódolnak, amelyek a sejtből való kijutás során 166 aminosavból felépülő érett fehérjévé alakulnak. Az IFN-omega 1 gén 172 aminosavból álló érett fehérje kódját hordozza (Dron és Tovey, 1991).

Az IFN-alfa gén fontos régiója a "vírus responsive element" (VRE), amely felelős a gén vírusok általi aktiválhatóságáért (Weidle és Weissmann, 1983).

A humán IFN-gammát egyetlen gén kódolja, ezt izolálták és szekvenciáját is meghatározták (Gray és Goeddel, 1982). A génben három intron és négy exon található, ezek a 12-es kromoszómán helyezkednek el (Naylor és mtsai, 1983; Taya és mtsai, 1982). A kódolt polipeptid 166 aminosavból áll, amelyek szekvenciájából két glykozilációs helyre lehet következtetni. A 20 kDa molekulasúlyú fehérje egyik helyen, míg a 25 kDa-os fehérje mindkét helyen glykozilált (Rinderknecht és mtsai, 1984; Yip és mtsai, 1982). A fehérjére jellemző, hogy nagy mennyiségű bázikus aminosavat tartalmaz, és ez összefüggésbe hozható biológiai aktivitásának savlabilis voltával (Devos és mtsai, 1982).

3. Az interferonok indukciója, és az interferon-inducerek

3.1. Az IFN-alfa és az IFN-béta indukciója

Az interferont a vírusinterferencia jelenségének vizsgálata során fedezték fel (Isaacs és Lindenman, 1957). A vírusok mindmáig a legalaposabban tanulmányozott IFN-inducerek. Szinte az összes állati vírusról (mind az RNS, mind a DNS tartalmú vírusokról) leírták az IFN-t indukáló képességet in vitro és/vagy in vivo körülmények között (Stewart, 1980; De Clercq, 1981; Ho, 1984). Az IFN-alfa/béta termelése szinte általános jelenség a vírusfertőzést

követően. A leghatékonyabb IFN-inducernek a duplaszálú RNS-t (dsRNS) tekintik. A dsRNS-t tartalmazó vírusok közül a Bluetongue vírusról (Reovírus család) kimutatták, hogy emberi sejtkultúrában magas titerű IFN termelését idézi elő (Jameson és Grossberg, 1979). Az egyszálú RNS-t tartalmazó vírusok között az influenza vírus jól ismert, hatékony inducer, hiszen Isaacs és Lindenmann az interferon első leírása során ezt a vírust használta inducerként csirkesejtekben. Humán monocyták in vitro influenza A vírussal fertőzve IFN-alfát produkálnak (Roberts és mtsai, 1979). A paramyxovírusok közé tartozó Sendai vírusról Gresser (1961) írta le elsőként, hogy emberben IFN termelést képes kiváltani. A Newcastle disease vírus (NDV) széles körben alkalmazott IFN-inducer. Az NDV szaporodása során keletkező duplaszálú RNS szakasz felelős az IFN-t indukáló képességért (Marcus és mtsai, 1983). A vesicular stomatitis vírus (VSV, Rhabdovírus család) esetében is kimutatták a dsRNS replikációs intermedier szerepét az IFN indukciójában (Marcus és Shekellick, 1980).

A DNS tartalmú vírusok interferont indukáló hatása is sok forrásból ismeretes. Az adenovírusok csirke sejtekben indukálnak IFN-t (Béládi és Pusztai, 1967). A humán cytomegalovírossal és varicella-zoster vírussal fertőzött sejtek IFN-t termelnek (Váczi és mtsai, 1965). Rasmussen és munkatársai a Herpes simplex vírus IFN-indukáló hatásáról írtak (1974). A DNS tartalmú vírusok esetében az indukcióért felelős stimulus mibenléte nem tisztázott. Egyes DNS-vírusok szaporodása során kimutattak dsRNS köztiterméket, de mások esetén ez nem volt megfigyelhető.

A szintetikus duplaszálú RNS polimerek nagy hatékonysággal indukálnak IFN-alfát és bétát, pl a poli-rI-rC (Field és mtsai, 1967). Ez is alátámasztja a dsRNS jelentőségét az IFN-indukcióban.

A dsRNS-en kívül egyéb vírusalkotók is képesek IFN-t indukálni, pl a Herpes simplex vírus és az NDV antigénjei (Capobiancti és mtsai, 1985), és a Sendai vírus glycoproteinjei egér lépsejtben indukálnak I típusú IFN-okat (Ito és mtsai, 1978).

A vírusokon kívül egyéb mikroorganizmusok is indukálnak interferon termelést, így baktériumok, gombák és protozoonok. Sok baktériumról leírták ezt a képességet, köztük a Corynebacterium parvum-ról (Kirchner és mtsai, 1979) és a Listeria monocytogenes-ről (Nakane és Minagawa, 1981).

A bakteriális endotoxinok főleg macrophagokban váltják ki IFN termelését. Ezt a rendszert leginkább egerekben vizsgálták. Az intracelluláris parazita rikettsiák, a mycoplasmák, a protozoonok közül a Toxoplasma gondii, Plasmodium berghei, Trypanosoma cruzi és Plasmodium falciparum a fontosabb nem virális fertőző ágensek, amelyekről kimutatták, hogy IFN-alfa/béta képződését idézik elő (Ho, 1984; De Maeyer és De Maeyer-Guignarde, 1988).

3.2. Az IFN-gamma inducerei

Az IFN-gammát produkáló sejtek spektruma szűk, a T lymphocytákra és az NK sejtekre korlátozódik. Akkor termelődik, ha ezek a sejtek aktiválódnak külső ágensek hatására, és sok endogén faktor is regulálja az IFN-gamma termelését (Billiau és Dijkmans, 1990).

Tehát ezek a lymphocyták IFN-gammát termelnek válaszként mitogénekre és olyan bakteriális és virális antigénekre, amelyekkel szemben már szenzitizálódtak, allogén sejtekre és lymphocyták felszíni antigénjei elleni ellenanyagokra (Epstein, 1982). A legfontosabb fiziológiás stimulus tehát a specifikus antigén olyan sejtek esetében, amelyek hordozzák a megfelelő receptort. Ez az antigén lehet virális eredetű, pl. a herpes labialisban szenvedő betegek macrophag és lymphocyta kultúrájában a HSV antigén hatására IFN-gamma termelést észleltek (Valle és mtsai, 1975). Blackman és Morris (1984) Semliki forest vírussal (SFV) immunizált állatok lymphocytáinak IFN-gamma termelését írták le SFV antigén hatására.

Bakteriális antigének hatására is megfigyeltek IFN-gamma produkciót. A Streptococcus pyogenes M proteinjének egy peptidfragmensét IFN-gamma inducernek találták (Baron és mtsai, 1985). IFN-gamma képződik mycoplasma-stimulusra humán lymphocytákban (Cole, 1983) és rickettsia hatására egerekben (Turco, 1983). Egér lépsejtek IFN-gammát termelnek, ha Escherichia coli lipopoliszachariddal (LPS) stimulálják (Blanchard és mtsai, 1985). Green és mtsai (1969) tuberkulin PPD-vel, tisztított tetanus toxoiddal és diphtheria toxoiddal váltottak ki immunizált donorok lymphocytáiban IFN-gamma termelést. Youngner és Salvin (1973) kimutatta, hogy BCG-fertőzött egerek specifikus antigén (alt-tuberkulin) hatására IFN-gammát termelnek. A hővel előlt Listeria monocytogenes T-sejt-macrophage keverékben IFN-gamma termelését váltja ki (Nakane és Minagawa, 1981).

A tumorantigének is lehetnek IFN-gamma inducerei. Bursuker és

Pierce (1990) megfigyelései szerint in vivo tumor-szenzitizált egerek T sejtjei IFN-gammát termelnek in vitro újbóli stimulálás eredményeként.

Az aspecifikus vagy poliklonális mitogének hatására bekövetkező IFN-gamma termelésről először Wheelock számolt be 1965-ben, amikor Phytohaemagglutinin (PHA) kezelésre az addig ismert vírus indukálta IFN-től eltérő tulajdonságú IFN keletkezését írta le lymphocytákban. A PHA-t Phaseolus vulgaris-ból nyerik, humán lymphocytá kultúrában sejtmeagnagyobbodást és mitotikus aktivitást vált ki, IFN-gamma termelést idéz elő (Friedman és Cooper, 1967). Egyéb növényi lektineket, így a Lens culinaris-ból kivont lentil lektint (Kauppinen és mtsai, 1985), és a Canavalis ensiformis-ból nyert Concanavalin A-t (Con A) is alkalmazzák IFN-gamma indukereként.

Egér lépsejtekben Johnson és mtsai (1977) a Con A és a PHA mellett hatásos IFN-gammát indukáló mitogénnek találta a Staphylococcus aureus A törzs hőstabil, vízoldékony toxinját, az enterotoxin A-t. Osborn (1979) ennek az inducernek a felhasználásával nagy mennyiségben tudott egér IFN-gammát termelni.

Goldfarb és Herbermann (1981) a phorbol vagy diterpén észterekről leírta, hogy a leghatásosabb tumorpromoterek, amelyek önmagukban nem karcinogének, de más karcinogén anyagok hatását fokozzák. Hatásaik közé tartozik a T lymphocyták aktiválása. A TPA-t (tumor promoting agent) vagy másként PMA (12-phorbol-13-myristate-acetate)-t Yip és mtsai (1981/a) perifériás mononukleáris sejtekben IFN-gamma inducernek találták. Megfigyelték, hogy a mezerein,

amely a TPA-hoz hasonló szerkezetű diterpén észter, hatásában meg-
egyezik vele. A TPA-val való előkezelés fokozza a PHA-val, vagy
egyéb mitogénnel indukált IFN-gamma produkciót (Yip és mtsai
1981/b). A Con A és PMA együttes IFN-gammát indukáló hatását írta
le Reem és Yeh (1984). Siggins és mtsai (1985) a mezerein és mito-
gén kombinált alkalmazásakor az IFN-gamma mRNS szint növekedését
figyelték meg. Az IFN-gamma gén mitogén általi aktiválása fehérje-
szintézistől független volt, a mezerein hatására bekövetkező IFN-
termelés fokozását a fehérjeszintézis gátlása megszüntette.

Az A 23187 alacsony molekulatömegű kalcium ionophore, amely a
T sejtekre mitogén, és IFN-gamma termelést indukáló képességéről
Dianzani és mtsai 1980-ban számoltak be. A TPA ezzel a mitogénnel
együtt adva is fokozza az IFN-gamma produkciót humán perifériás
lymphocytákban (Braude, 1983). Antonelli és mtsai (1988) is azt
mutatták ki, hogy az A23187 és a phorbol észterek szinergizálják
egymás IFN-gamma termelést előidéző aktivitását lymphocytákban.

Mitogénként hatnak a T sejtekre az antilymphocyta savók,
illetve a T sejt felszíni determinánsai elleni ellenanyagok. Elő-
ször Falcoff (1972) írta le, hogy a specifikus antilymphocyta
globulinok pH 2 érzékeny IFN termelésére készítetik a humán lympho-
cytákat. Az OKT3 monoklonális ellenanyag szintén T sejt mitogén,
minden perifériás T sejttel reagál, és monocyták jelenlétében
IFN-gamma termelést vált ki, amit a TPA szintén fokoz (Chang és
mtsai, 1982).

Dianzani és mtsai 1979-ben leírták, hogy galaktóoxidáz enzim-
mel IFN-gamma indukálható humán lymphocytákban. Az IFN-gamma

indukció receptorai galaktóz maradékot tartalmazó glycoproteinek lehetnek (Dianzani és mtsai, 1980).

Vitatott az interleukin 2 (IL-2) IFN-gamma termelést kiváltó képessége. A lektint és IFN-t nem tartalmazó humán IL-2 humán perifériás T lymphocytákban nagy mennyiségű IFN-gammát indukált. A Con A szuboptimális dóziséval szinergismusan fokozta az IFN-gamma produkciót (Kasahara és mtsai, 1983). Nem stimulált humán perifériás lymphocytákban (Vilcek, 1985) és tisztított humán T sejt preparátumban (Le, 1986) IL-2 hatására bekövetkező IFN-gamma termelésről számoltak be. Handa és mtsai (1983) figyelték meg, hogy IL-2 jelenlétében tenyésztett egér NK sejt klónok jelentős NK-aktivitással bírnak, és IFN-gammát termelnek. Yamamoto (1982) IL-2-vel kezelt egér lépsejtekben figyelt meg IFN-gamma képződést. Reem és Yeh (1984) az IL-2 IFN-gamma produkciót moduláló szerepét hangsúlyozza. Az IL-2 tisztított T sejtekben fokozza az IL-2 receptor kifejeződését és az IFN-gamma termelést. Croll és Morris (1986) szerint mitogén hiányában az IL-2 kevés IFN-gamma termelést vált ki leukocytákban, ami a mitogénindukció nélkül is jelenlevő kis számú IL-2 receptor pozitív sejteknek tulajdonítható. Az IL-2 kötődést és IL-2 receptor kifejeződését gátló dexamethason és anti-Tac ellenanyag gátolta az IFN-gamma termelődését.

A T lymphocyták antigénnel való stimulálása akcesszorikus sejtfunciót igényel, MHC II restrikció alatt áll, és antigénspecifikus. Ebben a tekintetben az IFN-gamma termelés a többi T sejt funcióhoz hasonlít (Williams és mtsai, 1984; Morris, 1988). Az IFN-gamma gén aktiválódása a lymphocyta stimuláció elsődleges

eseménye. Az IFN-gamma keletkezése megelőző IL-2 termeléstől és IL-2—IL-2-receptor kötődéstől függ. Ugyanígy a mitogének és az IL-2 által kiváltott IFN-gamma indukcióhoz akcesszórius sejtek szükségesek, macrophagok vagy dendritikus sejtek; az akcesszórius sejtfunkcióhoz a HLA Dr rendszer integritása és IL-1 termelés igényelt (Le és mtsai, 1985). Az akcesszórius sejtek Fc receptoraik révén a T3 komplex-szel való keresztkötések kialakításával és IL-1 kiválasztással vesznek részt a T sejtek aktiválásában. Az IL-1 az IL-2 hatását támogatja. A TPA helyettesíti az akcesszórius sejtfunkciót a T sejt aktiválásában, ugyanazon mechanizmus alapján hatnak (Palacios, 1985). A TPA a proteinkináz C ismert aktivátora (Palacios, 1985; Antonelli, 1988). Az akcesszórius sejtek hatására stimulálódik a diacilglicerol szintézis, és növekszik a T sejtekben a Ca^{2+} koncentráció, ez aktiválja a proteinkináz C-t. A mitogének első mérhető hatásainak egyike a citoszol szabad Ca^{2+} koncentrációjának fokozódása (Allwood, 1971; Tsien és mtsai, 1982). Az A23187 növeli a membránok Ca^{2+} -permeabilitását (Akerman és Andersson, 1984). Antonelli és mtsai szerint (1988) a TPA és Ca^{2+} -ionophore utánozzák az antigén v. mitogén indukálta jelet, és ezzel a T lymphocyták aktiválódásának korai lépéseit, és ebben nemcsak a proteinkináz C aktiválódásának, hanem a Ca-calmodulin rendszernek is szerepe van.

4. Az interferonok receptorai

Az interferonok hatásait fajspecifikus sejtfelszíni recep-

torokon keresztül fejtik ki. Az IFN receptoroknak két típusa létezik. Az egyik az I típusú IFN-okkal lép kölcsönhatásba, a másik pedig a II típusú IFN-nal (Branca és Baglioni, 1981.). Ezért az IFN-alfát, bétát és omegát kötő receptorokat I típusú receptornak hívják, a másikat II típusúnak. Az IFN-alfa és béta között fennálló strukturális homológia magyarázza, hogy egyforma receptorkötő doménjük van, és közös receptort használnak. A különféle IFN-alfa altípusok eltérnek a receptorhoz való kötődésük affinitása tekintetében, pl. a humán IFN-alfa 1 kisebb affinitással kapcsolódik a humán sejtekhez, mint az alfa 2 altípus (Aguet és mtsai, 1984).

Matematikai kalkulációk alapján a sejtek felszínén található IFN receptorok száma 10^3 nagyságrendben van, egyéb aktivátor molekulákhoz hasonlítva ez kis szám. Példaképpen: a humán leukocita IFN Daudi sejteken 4200/sejt receptorhoz kötődhet (Mogensen és mtsai, 1981), a rekombináns IFN-alfa 2 B sejteken 444 kötőhelyet talál (Hannigen és mtsai, 1986). A rekombináns IFN-gamma monocytákon 4000 (Finbloom és mtsai, 1985), T sejteken 500 kötőhelyhez kapcsolódhat (Faltynek, 1986).

Mindkét típusú IFN receptor génjének kromoszómalokációja ismert. Az I típusú IFN receptor génje a 21-es kromoszómán található (Tan és mtsai, 1973; Slate és mtsai, 1978). A humán IFN-gamma receptorának génje a 6-os kromoszómára lokalizálódik (Rashidbaigi és mtsai, 1986; Kung és Bekesi, 1986). Megfigyelték azonban, hogy a humán IFN-gamma aktivitásának kifejtéséhez a 6-os kromoszóma által nyújtott fajspecifikus receptoron kívül a 21-es kromoszóma által meghatározott szintén fajspecifikus transzducer is szüksé-



ges, amely a receptorhoz való kötődés hatására kialakuló biológiai választ serkenti (Jung és mtsai, 1987).

Újabban klónozták a humán I típusú receptor mRNS-ének megfelelő cDNS-t (Uze és mtsai, 1990), ez egy 63485 dalton molekulatömegű fehérjét kódol, ami jelentősen kisebb a korábban közltekénél (110-160 kDa, Pestka, 1986). Az eltérés a fehérje glykoziláltságából eredhet, hiszen 15 lehetséges glykozilálási hely található rajta. A klónozott receptor segítségével az IFN-alfa és béta valamennyi biológiai aktivitása nem váltható ki, felmerül egyéb esetleg fajspecifikus faktorok szükségessége (Mariano és mtsai, 1992). Aguet és mtsai (1988) elvégezték az IFN-gamma receptorának klónozását és expresszióját. Megállapították, hogy a receptor fehérje 489 aminosavból épül fel, és 17 aminosavnyi szignálpeptidet hordoz. A natív IFN-gamma receptort tisztították és jellemezték: a kb. 90 kDa molekulatömegű proteinlánc, extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris doménekkel rendelkezik. Az extracelluláris rész proteázokra aránylag rezisztens, a sejten belüli rész pedig érzékeny (Stüber és mtsai, 1992).

5. Az interferonok hatásai

Bár az IFN-alfa,-béta és agamma különböznek egymástól az indukáló ágensek és molekulaszervezetük tekintetében, hatásaik terén azonban sokban megegyeznek. Ezek az antivirális állapot indukciója, antiproliferatív (sejtszaporodást gátló hatás), macrophagok aktiválása a tumorsejtek és mikrobák elpusztítására, az NK sejtek

aktivitásának serkentése és az MHC antigének kifejeződésének fokozása. Ezen hatások nagy része a nemspecifikus védekezést képviseli a szervezetben, kivéve a T sejtek által termelt IFN-gamma specifikus antigén hatására, mégis mindhárom IFN fontos immunreguláló anyag, mivel kifejezett hatással bírnak a specifikus immunválaszban résztvevő T sejtekre.

5.1. Az interferonok hatásmechanizmusa

Az IFN-ok hatásait oly módon fejtik ki, hogy a célsejt IFN-receptorához való kötődés által egy jelátvivő rendszer lép működésbe, amely a sejt magjában több gén gyors és átmeneti indukcióját, míg mások gátlását eredményezi. Az I típusú IFN-ok és az IFN-gamma által indukált gének különböznek egymástól, de átfedés is megfigyelhető. Weil és mtsai (1983) leírása szerint ugyanazon antivirális aktivitású IFN-alfa/béta és IFN-gamma hatására T 21 sejtekben 12, a kezeletlen sejtekben nem jelenlevő fehérje termelődik, ezekből 6 csak az IFN-gamma kezelésre jelenik meg.

A jelátvitelnek több reakcióútját vizsgálták a különböző enzimek működését gátló szerek és mutáns sejtvonalak alkalmazásával. Bizonyított a diacyl-glycerol (DAG) koncentrációjának átmeneti, gyors növekedése IFN hatására. A DAG forrása lehet a Daudi sejtben az inozitol-foszfát (Yap, 1986), a foszfatidilkolin a HeLa sejtekben (Pfeffer és mtsai, 1990), vagy az arachidonsav a foszfolipáz A_2 aktivitásán keresztül a 3T3 egér sejtekben (Hannigan és Williams, 1991).

A jelátvivő rendszer következő tagja a protein kináz C (PKC), hiszen a DAG aktivátora ennek az enzimnek. A PKC többféle izoformája közül a PKC tűnik fontosnak az IFN-alfa biológiai hatásának kialakulásában (Pfeffer és mtsai, 1991).

Az I típusú IFN-ok hatására aktiválódik az IFN-stimulálta génfaktor 3, az ISGF3 (Dale és mtsai, 1989). Az IFN-gamma esetében nem találták meg ezt a faktort (Michael és Lerner, 1992). Az ISGF3 a sejt magjába vándorol, ahol a DNS-en az IFN-stimulálta response elemekhez (ISRE) kapcsolódik, amelyek az IFN regulálta gének közelében találhatók. Az IFN-gamma egy gamma-aktiválta faktor (GAF) révén a magban a DNS gamma-aktiválta szekvenciájához (GAS) kapcsolódik, ami a guanilát kötő fehérje (GBP) génjének része. Ez a GAS nem azonos a génhez tartozó ISRE-vel (Stark és Kerr, 1992).

Az IFN-aktiválható gének által kódolt mRNS-ek transzlációja során keletkeznek az IFN-indukálható fehérjék, ezek száma meghaladja a 30-at. Az IFN-nal kezelt sejtekben indukált fehérjék közül mutat be néhányat az I. táblázat (Sen és Lengyel, 1992).

Az interferonok biológiai hatásait a II. táblázat foglalja össze (Borden, 1992).

I. táblázat

INTERFERONOK HATÁSÁRA TERMELT FEHÉRJÉK

Elnevezés	Funkció
$(2'-5')(A)_n$ synthetase	$(2'-5')(A)_n$ szintézis
p68 Kinase	Fehérje phosphorylálása
Indolamine 2,3-dioxygenase	Tryptophan degradáció
Mx	Influenzavírus ellenes hatás
MHC I. osztály	Immunválasz regulációja
MHC II. osztály	Immunválasz regulációja
β_2 -Microglobulin	Immunválasz modulálása
ICAM 1*	Immunválasz modulálása

* Intracellular adhesion molecules

II. táblázat

INTERFERONOK HATÁSAI

Mikrobaellenes hatás

RNS vírusok

DNS vírusok

Intracelluláris egyéb pathogenek

Sejtproliferáció gátlás

Differenciálódás fokozás

Enzim indukció

2'-5'-öligoadenylsav synthetase

Protein kinase

Indolamine 2,3-dioxygenase

Felszíni antigen-expresszió fokozás

MHC I és II osztály*

Effektor-sejt aktivitás fokozás

T sejt, NK sejt

Monocyta

Macrophag aktivitás fokozás

Toxikus oxygenmetabolitok

Monokin termelés

* Az alfa- és béta-IFN csak az MHC I expressziót fokozza

5.2. Az interferonok antimicrobiális hatásai

Az IFN-ok aktivitásai közül az antivirális állapot létrehozása a legjobban jellemzett. Minden vírus szaporodása gátolható IFN-nal kisebb-nagyobb mértékben. A vírusok érzékenyek az IFN hatására a replikációjuk különböző szakaszaiban. Ezek a szakaszok: a penetráció, az "uncoating", a transzkripció, a transzláció, az összeépülés, az érés és a kijutás a sejtéből.

A penetráció gátlását csak a VSV esetében figyelték meg (Whitaker-Dowling és mtsai, 1983). Az "uncoating" gátlását Aboud és mtsai írták le egér leukémia vírussal kapcsolatosan (1980). Transzkripció-gátlást kevés esetben idéz elő az IFN. A polimerázal bíró RNS vírusok közül a VSV transzkripciójának IFN-alfa/béta általi és ennél enyhébb IFN-gammával történő gátlását tapasztalták (Ulker és Samuel, 1983; Belkowsky és Sen, 1987). Krug és mtsai (1985) szerint az influenza vírus genomjának a virionnal asszociált polimeráz általi primer transzkripcióját az IFN az Mx protein révén gátolja egérben. Pavlovic és mtsai (1992) jelentős mértékű gátlást figyeltek meg az influenza vírus RNS-transzkripciójában az IFN-indukálta Mx1 protein hatására.

Ez az egérben leírt Mx1 fehérje az IFN-alfával, vagy bétával kezelt sejtek magjában akkumulálódik. Az IFN-gamma gyenge inducere az Mx1 fehérjének. Emberben az Mx1 proteinhez hasonló MxA és MxB fehérjék szintetizálódnak az I típusú IFN-ok hatására, és ezek a fehérjék a citoplazmában találhatók (Aebi és mtsai, 1989). Az MxA-ról kimutatták (Staeheli és Pavlovic, 1991), hogy gátolja a VSV

mRNS szintézisét, ami a cytoplazmában zajlik le. Az MxA fehérje az influenza vírus szaporodását (transzkripciója a magban történik) is képes gátolni, tehát itt feltételezhetően nem a transzkripciót befolyásolja.

Az Mx fehérjékhez hasonló az élesztőben azonosított Vps 1p fehérje (Rothman és mtsai, 1990), és a mikrotubulusokkal asszociált D100 dynamin (Obar és mtsai, 1990), és ezekre mind jellemző a GTP kötő képesség. A két utóbbi protein fontos szerepet játszik a fehérjék intracelluláris mozgásában, az Mx proteinek hatásai is feltételezhetően hasonló aktivitásnak köszönhetők.

A vírusok transzlációját befolyásoló IFN-ok által indukált enzim a 2'-5' oligo-adenilsav szintetáz (2'-5'A synthetase). Ezt az enzimet az IFN-alfa és IFN-béta sokkal hatékonyabban indukálja, mint az IFN-gamma (Verhaegen-Lewalle és mtsai, 1982). Az enzimet dsRNS aktiválja, és a 2'-5'A szintetáz ATP-ből 2'-5' kapcsolódású oligomereket szintetizál, a trimerek a leggyakoribbak. Ezek a 2'-5'A-nak nevezett oligomerek aktiválnak egy endogén endoribonukleázt, az RN-áz-L-t. Ez az enzim egyszálú vírus vagy sejt eredetű RNS-t bont, ezáltal a vírusszaporodás gátlódik (Hovanessian és mtsai, 1979). Bebizonyosodott azonban, hogy a 2-5A reakcióút szelektív az antivirális állapot létrehozása tekintetében, mivel csak a picornavírusok replikációjának gátlása korrelál egyértelműen a 2-5A szint emelkedésével (Chebath és mtsai, 1987).

A proteinkináz reakcióút szintén felelős a vírusok transzlációjának gátlásáért, és az IFN-kezelt sejtekben dsRNS jelenlététől függ. Ez a proteinkináz (P1) az eukariota sejtekben a fehérjeszin-

tézis eIF2 iniciációs faktorának alfa alegységét foszforilálja, ezáltal gátolja a fehérjék szintézisét (McNair és Kerr, 1992). Az IFN-indukálta antivirális állapotban betöltött szerepére világít rá az is, hogy igen sokféle vírus rendelkezik olyan eszközökkel, amelyek kivédik a P1/eIF-2 proteinkináz hatását: az adenovírusok és a humán immundeficiencia vírus (HIV-1) olyan RNS-t produkálnak, amely blokkolja az enzimaktivitást; a reovírusok és a vaccinia vírus protein terméke megköti az enzimet aktiváló RNS-t, a poliovírus esetében ez a fehérje a kináz degradálását idézi elő, az influenza vírus egy sejfehérjét használ fel a kináz gátlására (Samuel, 1991).

A vírusszaporodás következő szakaszai, amelyeket befolyásol az IFN, az a vírus összeépülés, érés és kijutás a sejtéből. A retrovírusokkal krónikusan fertőzött sejtekben IFN hatására RNS-ben defektív vírusok akkumulálódását figyelték meg. Rendellenesnek találták a különféle vírusfehérjék beépülését az érett virionba (Billiau és mtsai, 1976; Pitha és mtsai, 1980). Rekombináns IFN-alfa és IFN-béta hatására blokkolódik a HSV1 virion összeépülése (Chatterjee és mtsai, 1985).

Az I és II típusú IFN-ok különböznek egymástól antivirális hatásuk mechanizmusa tekintetében, ezt mutatják Rubin és Gupta (1980) megfigyelései, mely szerint az I típusú IFN-ok a VSV és EMC vírusok szaporodását erősebben gátolják, míg a reovírusok és a vaccinia vírus a II típusú IFN-nal szemben mutattak nagyobb érzékenységet. Az IFN-gamma receptorral nem rendelkező mutáns egerekben a korai védelem a vaccinia vírussal szemben csökkent mértékű

volt, azonban a VSV fertőzés menete változatlan maradt (Huang és mtsai, 1993).

A kétféle IFN-típus eltérő antivirális mechanizmusa okozhatja, hogy együttes alkalmazásuk során gyakran figyeltek meg szinergista hatásfokozódást. Czarnecki és mtsai (1984) humán melanoma sejtekben HSV1 szaporodásának gátlása során megfigyelték, hogy az IFN-alfa és IFN-béta antivirális hatását fokozta az IFN-gamma. Fleischmann és mtsai (1979) egér sejtekben (L-sejt/Mengo vírus) írták le az IFN-béta és IFN-gamma szinergista antivirális aktivitását. A protektív hatás a várható additív aktivitásnál 5-20-szor nagyobb volt. A humán cytomegalovírus plaqueformáló képességét és a vírusprodukciót humán embrió fibroblaszt tenyészetben gátolta az IFN-alfa, erősebben az IFN-gamma, és a kombinált alkalmazásuk szinergizmust eredményezett.

Az IFN-ok a vírusok szaporodásán kívül a baktériumok és a protozoonok szaporodását is gátolják. Sokféle baktérium kiváltja IFN termelődését, és vizsgálták annak szerepét a fertőzés kivédésében. A Streptococcus pneumoniae fertőzés leküzdésében direkt vagy indirekt módon az M protein által indukált IFN-gammának jelentős szerepet tulajdonítanak (Baron és mtsai, 1985). Az IFN-gamma receptor nélküli mutáns egerekben bizonyították az IFN-gamma döntő szerepét az intracelluláris parazita Listeria monocytogenes elleni korai védelemben (Huang és mtsai, 1993). A defektív IFN-gamma génnel bíró egerekben a Mycobacterium bovis szubletális dózisa 10-100-szoros mortalitást okozott a vad típusú egerekkel összehasonlítva (Dalton és mtsai, 1993). Az IFN-gamma gátolja a Chlamydia trachomatis szaporodását HEp-2 sejtben (Shemr és Sarov, 1985).

Egyre több a bizonyíték arra, hogy az interferonok szerepet játszanak a szervezet protozoonok elleni védelmében. A malária kórokozójának (Plasmodium berghei) fejlődését májsejtekben in vitro gátolni lehetett IFN-gammával (Schofield és mtsai, 1987). Az endogén és exogén IFN-gamma fontos szerepet tölt be a Trypanosoma cruzi fertőzés kivédésében (Silva és mtsai, 1992). A Toxoplasma gondii szaporodását az IFN-gamma az intracelluláris triptofán degradációja révén korlátozza (Pfeffer, 1984).

5.3. Az interferonok antiproliferatív hatása

Az IFN-ok első közölt nem antivirális aktivitása a sejtszaporodásgátlás (Paucker, 1962). Sejtkultúrában az interferonok normális és malignus sejtek szaporodását egyaránt képesek gátolni. Ennek az aktivitásnak nem tisztázott a mechanizmusa. Az I típusú IFN-ok befolyásolják a sejtciklust, prolongálni tudják egyes fázisait. A kritikus lépés a nyugalmi állapotból a mitotikus fázisba való átmenet. Az IFN-alfa hatására melanoma sejtek G0/G1 fázisból az S fázisba való átmenetének sebessége csökken, és az S fázis is meghosszabbodik (Creasey és mtsai, 1980). A kumulatív hatás néhány sejtgeneráció után cytosztatikus és cytocid. Resnitzky (1992) szerint a sejtciklus G0/G1 fázisban való blokkolása összefüggésben van azzal, hogy az IFN-ok gátolják a retinoblasztoma protein foszforilációját, és redukálják a **c-myc** onkogén expresszióját.

A mechanizmust illetően vannak bizonyítékok a 2-5A rendszer szerepére, de nem egyértelmű a korreláció a sejtekben a 2-5A szint

és az antiproliferatív hatás között (De Maeyer és De Maeyer-Guignard, 1988). Az IFN-gamma antiproliferatív hatása szoros összefüggésben van az adott sejtben az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim indukálhatóságával. Ez az enzim a triptofán lebontása révén érheti el a sejtnövekedés csökkenését (Ozake és mtsai, 1988). Több emberi eredetű malignus sejtvonalon leírták, hogy a rekombináns IFN-gamma antiproliferatív aktivitását a tápfolyadékhoz adott triptofán erősen csökkentette (De la Maza és Peterson, 1988). In vivo is megfigyelték a triptofán lebomlását IFN-gamma kezelés hatására, az IFN-alfa ilyen hatást nem váltott ki (Byrne és mtsai, 1986).

Rubin és mtsai (1983) osztályozták a különféle sejtvonalakat aszerint, hogy mennyire érzékenyek az IFN-alfa és az IFN-gamma antiproliferatív hatására: pl. a Daudi sejt IFN-alfára érzékenyebb, mint IFN-gammára, amire a HeLa és az U amnion sejt reagál erősebben, és mindkettőre gyengén érzékeny a MOLT4 sejtvonal. Tehát bár sok tumorsejt érzékenyebb az IFN-anticelluláris hatására, mint a normális sejtek, de ez sem általánosan érvényes, mert vannak meglehetősen rezisztens daganatsejtek is.

A tumorsejtek differenciálódását is befolyásolják az interferonok gyakran oly módon, hogy más differenciálódásra ható ágenssel együtt hatva potenciálják azok differenciálódást gátló vagy serkentő hatását. A HL60 humán promyelocita leukaemia sejtvonal differenciálódását az IFN-alfa és béta egyedül nem indukálja, de más kémiai inducerek hatását (TPA, retinolsav) stimulálja (Tomida és mtsai, 1982).

5.4. Az interferonok sejtfelszíni molekulákra kifejtett hatása

A sejtfelszíni antigének expressziójára gyakorolt IFN-hatás azért jelentős, mert ezek a membránelemek fontos szerepet töltenek be a sejtek között a direkt kontaktus kialakításában és a sejtek aktiválásának kezdeti fázisában.

A hisztokompatibilitási (MHC) antigének fontos tényezők sok immunológiai reakcióban. Az MHC I osztályúak minden szomatikus sejten előfordulnak, a célsejtek cytotoxikus T sejtek általi felismerésében játszanak szerepet. Az MHC II osztályú antigének B lymphocytaikon, Langerhans sejteken, dendritikus sejteken, aktivált T sejteken és macrophagokon találhatók. A B sejt/T sejt-macrophag kölcsönhatásban és az antigénprezentálásban van szerepük.

Mindkét IFN típus fokozza az MHC I osztályú antigének kifejeződését igen sokféle sejten. Az IFN-gamma még hatékonyabban fokozza az MHC I osztályú antigének expresszióját (Wallach, 1982).

Az IFN-gammára jellemző a többi IFN-tól eltérő módon, hogy az MHC II osztályú antigének kifejeződését is fokozza (Basham és Merigan, 1983). Mivel az MHC II osztályú antigének szükségesek az antigénprezentáláshoz, ezért az IFN-gammának fontos szerep tulajdonítható az antigénspecifikus immunválaszban. Vírusfertőzött és daganatos sejteken is megfigyelhető az MHC antigének expressziójának fokozódása IFN-ok hatására. SFV-sal fertőzött egér agysejteken bár a vírusantigénkifejeződés csökkent, az MHC I antigén expressziója fokozódott IFN-alfa, béta hatására, és ezzel a cytotoxikus T

sejt lízis fokozódott. Melanoma sejteken I osztályú antigének IFN-alfa hatására (Basham és mtsai, 1982), és a II osztályú antigének IFN-gamma hatására stimulálódnak (Houghton és mtsai, 1984).

Az IFN-ok által modulált felszíni molekulák közé tartozik az IgG molekulák Fc receptora is, amelynek fokozott megjelenését okozák az IFN-ok egér (Friedman és mtsai, 1980) és humán sejteken (Itoh és mtsai, 1980). IFN-alfán és bétán kívül az IFN-gamma fokozza az FcIgG1 receptorok megjelenését humán monocytákon és myeloid sejteken (Perussia és mtsai, 1983). Az Fc receptorok száma nem különbözik a receptor-mediálta fagocitózisban. A polimorf magvú neutrofil leukocyta Fc-gammaR1 expresszióját indukálja az IFN-gamma, és ezáltal ezen sejtek fagocitáló és ADCC aktivitása is nőtt (Petroni és mtsai, 1988).

Vizsgálták az interferonok hatását a tumorasszociált antigének (TAA) megjelenésére is. Kimutatták, hogy az IFN-alfa és IFN-gamma fokozza a CEA (carcinoembrionális antigén) expresszióját számos humán colon carcinoma sejtvonalon (Atallah és mtsai, 1979; Yan és mtsai, 1992). Kantor és mtsai (1988) leírták a CEA mRNS szintjének növekedését IFN-gamma kezelésre. Liao és mtsai (1982) a melanoma asszociált antigének fokozott kifejeződéséről számolt be melanoma sejtvonalakon IFN hatására. Melanomás betegekben fokozódott az anti-melanoma ellenanyag kötődése a tumorban IFN kezelés hatására (Rosenblum és mtsai, 1988). Ezen vizsgálatok eredményei alapul szolgálhatnak az IFN-terápia kiszélesítéséhez, a tumorantigének elleni monoklonális ellenanyagokkal vagy radioimmunterápiával való kombinált alkalmazásához.

A tumornekrózis faktor alfa (TNF-alfa) sejtreceptorainak kifejeződését különösen az IFN-gamma fokozza, az IFN-alfa és IFN-béta kevésbé volt hatásos, amikor melanoma, colon carcinoma és HeLa sejtvonalakat vizsgáltak (Tsujimoto és mtsai, 1986; Ruggero és mtsai, 1986). Mivel a TNF olyan monocyták, NK és cytotoxikus T sejtek által termelt anyag, amely hatásos cytosztatikus és cytotoxikus ágens, receptorának fokozott kifejeződése azt jelzi, hogy az IFN-gamma a tumorsejteket a TNF jó targetévé alakítja.

5.5. Az interferonok hatása az antigénspecifikus és a nem antigénspecifikus immunfolyamatok effektorsejtjeire

Az interferonok jelentősen befolyásolják a T sejtek működését az immunfolyamatok során. Az IFN-alfa és béta az IFN-gammától eltérő hatást gyakorol a mitogén és alloantigén stimulálta T sejt válaszára. A mitogének és IL-2 hatására bekövetkező T sejt proliferációt az IFN-alfa és béta jelentősen gátolja minden T sejt fenotípus esetén, ugyanakkor az IFN-gamma csak az IL-2 stimulált TH2 klónokra hat (Klimpel és mtsai, 1990). A cytotoxikus T sejtek (CTL) aktivitása IFN-alfa és béta hatására fokozódik allogén tumorsejtek ellen (Lindahl és mtsai, 1972) és kevert allogén lymphocita reakcióban (Heron és mtsai, 1976). Az IFN-gamma az IL-2-vel együttműködésben képes a CTL képződését kiváltani (Farrar és mtsai, 1981).

Az interferonok az NK sejtek aktivitásának fontos modulátorai. Az NK sejtek a spontán cytotoxikus hatásuk gyors aktiválódása

miatt a keletkező malignus sejtek, a vírusfertőzött sejtek elpusztításával fontos szerepet játszanak a szervezet az első védelmi vonalában.

Az NK sejtek aktivitásának IFN közvetítette fokozódása többféle tényezőből származik. IFN hatására megfigyelték a lítikusan nem aktív pre-NK sejtek aktív cytotoxikus NK sejté érését (Saksela és mtsai, 1979), a meglévő érett NK sejtek lítikus aktivitásának fokozódását (Santoni és mtsai, 1985) továbbá az NK sejtek reciklizálódó kapacitásának növekedését, azaz az ugyanazon NK sejtek által elpusztított targetsejtek számának növekedését (Ullberg és Jondahl, 1981). Az NK aktivitást oly módon is befolyásolják az IFN-ok, hogy képesek megvédeni normális és tumor targetsejteket az NK sejt mediálta lízistől (Welsh és mtsai, 1981).

Bár daganatos betegekben az IFN kezelés hatására fokozódik az NK aktivitás, azonban az IFN folyamatos adására az NK aktivitásnak a kezelés előtti szintre való visszaesését is leírták (Golub és mtsai, 1982). Ezt azzal magyarázták, hogy nagy dózisban és gyakran adták az IFN-t (Maluish és mtsai, 1983).

A K sejtekre és macrophagokra gyakorolt hatása révén az IFN-ok fokozzák az antitestfüggő celluláris cytotoxicitást (ADCC) (Ortaldo és mtsai, 1980; Spansberg és Heron, 1983).

A macrophagok és monocyták szoros együttműködésben vannak az interferon rendszerrel. Amellett, hogy maguk is termelnek interferont (IFN-alfát vagy bétát az inducertől függően), és hogy a T sejtek általi IFN-gamma termelés szabályozásában fontos szerepük van, a macrophagok immunológiai funkcióit jelentősen befolyásolják az

interferonok, különösen az IFN-gamma. A korábban leírt macrophag migrációt gátló faktorról (MIF) (Thurman és mtsai, 1985) és a macrophag aktiváló faktorról (MAF) (Talmadge és mtsai, 1986) bebizonyították, hogy azonosak az IFN-gammával.

Az interferonok részt vesznek a monokin szekréció szabályozásában is. Fokozzák a gyulladásos folyamatokban antikoagulánsként szereplő plasminogén aktivátor (Mogensen és Virelizier, 1987), az IL-1 és a TNF-alfa termelődését. Az IFN-alfa és béta, de különösen az IFN-gamma növeli az LPS hatására képződött IL-1 mennyiségét macrophagokban (Candler és mtsai, 1985; Arenzana-Seisdedos és mtsai, 1985).

A macrophagok fontos funkciója az intracelluláris patogén mikroorganizmusok fagocitálása és elölése, amely reaktív oxigén termékek segítségével megy végbe. Az IFN-gamma a macrophagok ezen hatását oxidatív anyagcseréjük fokozásával segíti elő (Nathan és mtsai, 1983). A tumorsejtek macrophagok által történő elpusztítása terén is megmutatkozik az IFN-alfa/béta és az IFN-gamma szinergista együtthatása (Pace és mtsai, 1985).

5.6. Az interferonok "priming" hatása

Az interferonokra jellemző tulajdonság, hogy önmaguk termelését elősegítik, azaz az interferonnal előkezelt sejtek az indukerek hatására gyorsabban, nagyobb mennyiségű IFN-t termelnek, mint a kezeletlen sejtek. Ez a "priming" jelensége (Stewart, 1979). Eleinte a "priming"-ot az interferonok inducere gyakorolt antivirá-

lis aktivitásával magyarázták, de később ez az elmélet megdőlt, hiszen a poli-rI-rC indukálta IFN termelődése is fokozható IFN-előkezeléssel (Rosztóczy és Mécs, 1970). Az antivirális állapot kifejlődéséhez fehérjeszintézis szükséges, míg a "priming" cikloheximid jelenlétében is kialakul. A sejtek "priming"-olt állapota rövidebb ideig áll fenn, mint az antivirális állapot (Rosztóczy, 1974). A "priming" mechanizmusa nem tisztázott, de interferon előkezelés hatására az IFN mRNS szint növekszik (Fujita és mtsai, 1979). A "priming" jelenségét leginkább egérben és IFN-bétával kapcsolatban vizsgálták. Az interferon gén szabályozásával kapcsolatos újabb eredmények szerint az IFN-béta gén promoter részén olyan szabályozó szakaszok találhatók, amelyekhez a gén transzkripcióját reguláló faktorok kapcsolódnak. Ilyen faktor többek között az "interferon regulatory factor" 1 és 2 (IRF1 és IRF2), amelyek közül az IRF1 inducer és IFN-ok (I és II típusú is) hatására a szabályozó génszakaszhoz kapcsolódva az IFN gén transzkripcióját aktiválja. Az IRF2 represszálja az átírást, tehát ez egy negatív reguláló elem (Fujita és mtsai, 1989; Harada és mtsai, 1989). Az IRF1 ezek alapján fontos eleme lehet az IFN "priming" jelenségének.

6. Az interferonok termelése és tisztítása

A humán interferonok embergyógyászatban antivirális és antitumor ágensként való alkalmazásának lehetősége a figyelmet a gyári méretekben történő előállítás felé irányította. A humán leukocyta IFN-t Sendai vírussal fertőzött fehérvérsejtekben először Kari



Cantell irányításával állították elő. Az első laboratóriumi leírás-tól (Strander és Cantell, 1966) kezdve lépésről lépésre javították a módszert, és 1976-ban már 10^{11} egység IFN-alfát tudtak termelni (Cantell és Hirvonen, 1977). 1978-ban 10^8 egység/ml titerű IFN-alfa előállításáról számoltak be. A Cantell-féle módszert alapul véve a SZOTE Mikrobiológiai Intézetében is kísérleteket végeztek humán leukocyta IFN előállítására nagy volumenben (Mécs és Béládi, 1977), és leírták magas specifikus aktivitású ún. "semi-crude" IFN előállítását (Tóth és mtsai, 1984). A munkák eredményeképpen szabadalmat írtak le az emberi leukocyta interferon (IFN-alfa) gyártására (1980), és ezt szabadalmat az EGIS Gyógyszergyár által kialakított interferongyártó üzemben hamarosan hasznosították is.

A leukocyta IFN (IFN-alfa) gyártásához a termelő sejteket egészséges donorok véréből a vörösvértest masszától és a plazmától elkülönített "buffy coat"-ból, azaz fehérvérsejtkoncentrátumból nyerik, amely egyébként terápiás célra nem használható. A fehérvérsejtek beszerezhetősége azonban korlátozott, ezért kerestek más sejtforrást is, pl az Epstein-Barr vírussal transzformált lymphoid sejtvonalat, a Namalwát. Ezt a sejtet is Sendai vírussal, vagy Newcastle disease vírussal fertőzve készítetik IFN termelésére. Ez az IFN 80-90%-ban megegyezik a leukocyta segítségével előállított IFN-nal, kis %-ban IFN-bétát is tartalmaz (Bodo, 1981). Az IFN-béta termeléséhez normális humán diploid sejtvonalakat használnak, inducerként pedig poli-rI-rC-t (Billiau és mtsai, 1973). Az IFN-gamma termelése perifériás vérből izolált lymphocytaikkal, vagy "buffy coat"-ból nyert leukocytaikkal történik (Langford és mtsai,

1979; De Ley és mtsai, 1980) többféle mitogént is alkalmaznak induként. A nyert ún. crude IFN-t tisztítják a specifikus aktivitás növelése, a szennyező fehérjék mennyiségének csökkentése érdekében. A tisztításra használt módszerek közül az IFN-alfa esetében a KSCN-dal történő precipitálás, és az etilalkohollal való frakcionált kicsapás Cantell és mtsai (1981) leírása szerint $1-2 \times 10^6$ NE/ml tisztaságú klinikai alkalmazásra megfelelő leukocyta IFN-t eredményezett. Kontrollált pórusú üveggyönggyel (CPG) való tisztítás is hasonló eredményt adott (Horowitz, 1986). Többen, pl. Rubinstein és mtsai, (1979) gélszűrést is alkalmaztak a tisztítás során. Immunaffinitás kromatográfiás eljárások során mind a szennyező fehérjék, mind az IFN elleni ellenanyagokat hordozó oszlopokat alkalmazták (Berg, 1977). A fibroblaszt IFN (IFN-béta) tisztításához, cink-kelát, Blue-Sepharose és ConA-Sepharose oszlopkromatográfiát is alkalmaztak. Az IFN-gamma tisztítására különféle affinitás-kromatográfiákat (CPG, szilikát, ConA-Sepharose, Poly(U)-Sepharose) és gélszűrést írtak le.

Mivel mindhárom IFN fajta (IFN-alfa, béta, gamma) génjét izolálták, és megvalósították expressziójukat rekombináns géntechnológiával baktériumokban, vagy más heterológ gazdasejtben, megnyílt az út a rekombináns IFN-ok ipari méretekben történő előállításához. A sokféle megismert IFN-alfa altípus közül az IFN-alfa 2a-t ("Roferon"), az IFN-alfa 2b-t ("Intron A"), IFN-alfa 1-et és az IFN-alfaD-t állítják elő megvásárolható, klinikai alkalmazásra kész preparátumként. A fentiekén kívül gyakran használt rekombináns interferonok az IFN-béta, az IFN-béta_{ser}, az IFN-gamma

("Actimmun") és a consensus IFN. A következő néhány természetes IFN készítményt alkalmazzák a klinikai gyakorlatban: IFN alpha (Leu) ("Finnferon"), IFN alpha NI ("Wellferon"), IFN beta ("Fiblaferon"), IFN gamma és a Magyarországon regisztrált leukocita IFN, az "Egiferon".

A rekombináns IFN-alfa termékek csak egyfajta molekulából állnak, míg a természetes leukocita IFN a kb.20 tagból álló IFN-alfa géncsalád termékeit tartalmazza. A sokféle IFN-alfa altípus létezésének értelme, vagy célja még ma sem tisztázott, de különbségeket fedeztek fel a génjeik expressziójának szabályozásában, az inducortól és a termelő sejtek típusától függően az altípus-összetételben, az altípusok biológiai aktivitásának mértékében, termelődésük "priming"-olhatóságában. Feltételezhető, hogy a természetes IFN-alfa altípus-összetételének fiziológias volta miatt a terápiás alkalmazása előnyösebb. Teljes értékű összehasonlítások a rekombináns interferonokkal ez ideig nem történtek. A természetes IFN-alfa előnyösebbnek látszik, mivel hogy a vele kezelt betegekben ellenanyagtermelődés az IFN-nal szemben ritkán, míg a rekombinánsokkal gyakran előfordul.

7. Az interferonok alkalmazása a humán terápiában

Az interferonok klinikai kipróbálásához először természetes interferonokat használtak, azonban ezek korlátozott beszerezhetősége miatt az elmúlt évtizedben főleg rekombináns DNS technológiával előállított interferonokat - legtöbb esetben IFN-alfát - al-

kalmaztak a terápiában. A rekombináns alfa altípusok segítségével sikerült meghatározni, hogy milyen rosszindulatú betegség és vírusfertőzés esetében ajánlatos az IFN-alfa terápia felhasználása. A III., IV. (Dorr, 1993) és V. táblázat (Sréter és Fehér, 1991) bemutatja a leginkább ismert alkalmazási területeket.

Bár a legtöbb esetben a rekombináns IFN-alfát használják, mégis szükség van a természetes interferonra, mivel ha a rekombináns altípussal szemben neutralizáló ellenanyag képződik a kezelt betegben, a terápia természetes IFN-alfával még hatásos lehet. Ezt a jelenséget a hajás sejtes leukaemia terápiájában figyelték meg leggyakrabban (Wussow és mtsai, 1991; Steis és mtsai, 1988), de leírták krónikus myeloid leukaemiában (Freund és mtsai, 1988) és vese carcinomában szenvedők esetében is (Prümmer, 1991).

Az IFN-gamma eddig megismert terápiás alkalmazása elsősorban az immunrendszerre gyakorolt hatásai alapján történik. A klinikai alkalmazásra ez esetben is általában rekombináns IFN-t használtak. Az IFN-gamma hatásosnak mutatkozott chronicus granulomatosus betegségben (CGD; Woodman és mtsai, 1992), lepromatosus leprában (Nathan és mtsai, 1990) és viscerális leishmaniasisban (Badaro és mtsai, 1990), amikor a szervezet számára a celluláris immunitás nyújt védelmet a betegséggel szemben. Metasztázisos vese carcinomában az IFN-gamma alkalmazása a betegek 31 %-ában hosszabb túlélést eredményezett (Otto és mtsai, 1988). Az előrehaladott condyloma acuminatum IFN-gamma terápiájában 50%-os részleges választ tapasztaltak (Kirsy és mtsai, 1986).

Megfigyelték, hogy az IFN-gamma más cytokinekkal, például TNF-el, IFN-alfával, vagy IL-2-vel kombinálva antitumor hatást fejtett ki, és a kezelt betegek immunológiai paraméterei javultak (Schüller és mtsai, 1992; Ernstoff és mtsai, 1992; Viens és mtsai, 1992). Az IFN-gamma tehát további perspektívát nyújt új terápiás stratégiák kifejlesztéséhez.

III. táblázat

AZ IFN-ALFA TERÁPIÁS HATÁSA HAEMATOLÓGIAI MALIGNUS
BETEGSÉGEKBEN

A tumor típusa	Válasz (%)
Hajás sejtes leukaemia	80-90
Chronicus myeloid leukaemia	
újonnan diagnosztizált	70-80
előrehaladott	10-25
Cutan T-sejtes lymphoma	
előzőleg nem kezelt	80
előzőleg kezelt	25
Non-Hodgkin lymphoma	
alacsony malignitású	40-50
intermedier és magas malignitású	15
AIDS-hez társult Kaposi sarcoma	20-40
Hodgkin lymphoma	20
Myeloma multiplex	
előzőleg kezelt	50
előzőleg nem kezelt	15-25
Chronicus lymphocytás leukaemia	10-15
Akut leukaemia	10-20

IV. táblázat

AZ IFN-ALFA TERÁPIÁS HATÁSA SOLID TUMOROK ESETÉN

A tumor típusa	Válasz (%)
Renal cell carcinoma	10-15
Malignus melanoma	20
Cervicalis displasia	80-90
Basalioma	90
Superficial bladder cancer	60-70
Malignus neuroendocrine (carcinoid) tumorok	30-60
Ovarium carcinoma	
szisztémás terápia	10-15
intraperitoneális terápia	40
Colorectalis carcinoma	
monoterápia	10
fluorouracillal kombinálva	40-80

V. táblázat

AZ IFN-ALFA TERÁPIÁS HATÁSA VÍRUSBETEGSÉGEKBEN

A betegség megnevezése	Válasz (%)
Chronicus hepatitis B	25-40
Acut hepatitis C	24-44
Condyloma acuminatum	36-53
Chronicus hepatitis delta	75 ^a
Papillomatosis	100 ^b

a = delta antigén negatív

b = sebészeti beavatkozás elkerülése

A DOLGOZAT CÉLKITŰZÉSE

Az interferonok in vitro megfigyelt biológiai aktivitásai, az antivirális, sejtszaporodást gátló és az immunrendszert moduláló hatásai felvetették in vivo terápiás alkalmazásuk lehetőségét. A 70-es évek elején biztató eredményekről számoltak be. Ezért az IFN-nal kapcsolatos kutatási irányok között megjelent a klinikai alkalmazás céljának megfelelő IFN készítmények előállítására szolgáló termelőrendszerek kidolgozása.

A SZOTE Mikrobiológiai Intézetében a humán IFN-alfa laboratóriumi méretekben történő előállítása után a nagyvolumenű termelés módszerének kidolgozása is megtörtént. Tisztítását és a preparátum fizikokémiai és biológiai tulajdonságainak leírását is elvégezték. A figyelem ezután az IFN-alfáénál erőteljesebb antitumor és immunmoduláló hatású IFN-gamma felé irányult, amely több biológiai aktivitás tekintetében az IFN-alfával szinergista hatást is mutatott.

Ezért a következő feladatokat tűztük ki célul:

1. Az IFN-gamma inducerek vizsgálata.
2. Az alkalmas inducer segítségével az IFN-gamma termelés optimális körülményeinek leírása.
3. Az előzőleg IFN-alfa termelésre használt sejtek újbóli felhasználását biztosító eljárás kidolgozása IFN-gamma produkció céljára.

4. Az előállított IFN-gamma tisztítása, és tisztított termék tulajdonságainak leírása.
5. Az IFN-alfa, az IFN-béta és az IFN-gamma "priming" hatásának vizsgálata, és ezen a téren való kölcsönhatásuk jellemzése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Anyagok

A23187 Ca-ionophore - Calbiochem

Concanavalin A (Con A) - Calbiochem

CPG-10 (controlled-pore glass beads) 75 A -

Electro-Nucleonics

⁵¹Cr C. I. S. - Amersham

Eagle-féle tápfolyadék - saját laboratóriumi készítmény

Ficoll 400 - Pharmacia

IFN-béta, részlegesen tisztított - Dr A. Billiau, Rega

Institute, Leuven, Belgium

MSK tápfolyadék (összetétele megegyezik az aminosavakat és

vitaminokat nem tartalmazó Eagle-féle

tápfolyadékéval) - saját laboratóriumi készítmény

PBS pH 7,2 (nátrium-foszfáttal pufferolt sóoldat) - TRIGON

Biotechnológiai Leányv.

RPMI 1640 tápfolyadék - TRIGON Biotechnológiai Leányv.

Sephacryl S-200 - Pharmacia

TPA (phorbol-12-myristate-13-acetate) - Sigma

Ultrogel AcA 54 - LKB

Uromiro - Bracco

2. Szérumok

FCS (magzati borjúsavó) - Gödöllő

Újszülött borjúsavó - Gödöllő

Humán gammaglobulinmentes szérum

Előállítás : készítéséhez nem alvadésgátolt vérből származó szérumot, vagy heparinnal stabilizált teljes vérplazmát használtunk fel. Állandó keverés mellett 0 °C-on, 24,6 % végkoncentrációig fokozatosan adagoltunk $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot. A keletkezett csapadékot centrifugálással távolítottuk el (1200 g, 30 perc, 4 °C), majd a felülúszót PBS-sel dializáltuk teljes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -mentességig. A gammaglobulinmentes szérumot Milipore szűrőberendezéssel, 0,2 μm pórusmérétű membránnal sterilre szűrtük, és felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

3. Sejtek

3.1. Humán fehérvérsejtek izolálása

3.1.1. A mononukleáris sejteket heparinos perifériás vérből 1,075 sűrűségű Ficoll-Uromiro grádiensen szeparáltuk (Böyum, 1968). Az interfázisból nyert fehérvérsejteket háromszor mostuk (600 g, 10 perc) PBS-sel, majd az üledéket 10 % magzati borjúsavót tartalmazó Eagle-féle tápfolyadékban szuszpendáltuk, és a sejtek életképességét trypankék festékekkel ellenőriztük.

3.1.2. Az NH_4Cl kezelt leukocytat a plazmától és vörösvértestektől (vvt) elkülönített fehérvérsejtekből ("buffy coat")

nyertük, amit a SZOTE Véradó Állomásán készítettek. 24 óránál tovább tárolt sejteket nem használtunk fel. A "buffy coat"-ban lévő vvt-eket 0°C hőmérsékletű NH_4Cl oldattal oldottuk. Egy rész "buffy coat"-hoz négy rész 0,83 %-os NH_4Cl oldatot adtunk, és jég között tartottuk 10 percig, a sejteket centrifugálással ülepitettük (800 g 10 perc, 4°C). Az üledéket MSK-ban, vagy Eagle-féle tápfolyadékban szuszpendáltuk, és az NH_4Cl kezelést megismételtük. A fehérvérsejt szuszpenziót 1:9 arányban NH_4Cl oldattal kevertük, és a továbbiakban az előbb leírt módon kezeltük. Az üledéket, amely csaknem kizárólagosan fehérvérsejteket tartalmazott, humán gammaglobulinmentes szérumot tartalmazó MSK-ban, vagy Eagle-féle médiumban szuszpendáltuk. A sejtszámot Türk-oldattal festve határoztuk meg.

3.2. Sejtkultúrák

HEp-2 humán carcinoma sejt

K562 erythro-myeloid leukaemia eredetű humán sejt

WISH humán amniális sejt

MDBK borjú vese sejt

A sejtvonalak fenntartása 5-10 %-os újszülött, vagy magzati borjúsavót tartalmazó Eagle-féle, vagy RPMI 1640 tápfolyadékban 5 % CO_2 tenziójú 37°C hőmérsékletű termosztátban történt.

4. Vírusok

4.1. VSV (vesicular stomatitis vírus) Indiana törzs

szaporítása 48 órás primer csirkeembrió fibroblaszt tenyészetekben

történt. Infektív titerét plaque titrálási módszerrel PFE (plaque formáló egység)/ml-ben határoztuk meg.

4.2. Sendai vírus

Cantell-féle törzset használtunk, amelyet 9 napos embrionált SPF (specific pathogenic free) tyúktojásokba oltva szaporítottunk. A tojásokat 7×10^4 EID₅₀ (tojás fertőző dózis) Sendai vírussal oltottuk. Keltetőben való 48 órás inkubálás után a tojásokat egy éjszakán át 4 °C-on tároltuk, majd az allantois folyadékot infúziós szerelék és vacuum pumpa segítségével kiszívtuk. Ezt a nyers vírusanyagot ultracentrifugáltuk (40 000 g, 30 perc, 4 °C), és a vírust tartalmazó üledéket 5 % humán gammaglobulinmentes szérumot tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk úgy, hogy a térfogata az eredeti harmincad része lett. A haemagglutinációs titere 9×10^4 HAE (haemagglutinációs egység)/ml, infektivitása 10^{10} EID₅₀ volt.

5. Az interferonok termelése

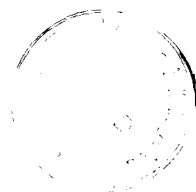
5.1. A humán IFN-alfa termelése

Az IFN-alfa termelésére "buffy coat"-ból nyert, NH₄Cl-dal kezelt leukocytákat használtunk. 1×10^7 /ml sejtszámú szuszpenziót készítettünk belőlük 2 mg/ml fehérjetartalmú, humán gammaglobulinmentes szérumot tartalmazó MSK tápfolyadékban. A 20 ml-es kultúrákat 200 NE/ml IFN-alfa jelenlétében 2 óráig rázattuk 37 °C hőmérsékletű vízfürdőben, majd 1/600 (33 µl) térfogatú tisztított Sendai vírussal fertőztük. További 20 órás 37 °C-on történő rázatás

után a sejtek felülúszóját centrifugálással (20 perc, 2000 g, 4 °C) összegyűjtöttük. A sejteket eldobtuk, vagy IFN-gamma termelésére használtuk. A nagytérfogatú IFN-alfa termelést követő IFN-gamma előállítás IFN-alfa termelő fázisában a 2435/80/1980 számú Mécs I., Tóth M., Béládi I. által leírt szabadalom szerinti IFN-alfa termelési eljárást alkalmaztuk.

5.2. A humán IFN-gamma termelése

Erre a célra Ficoll-Uromiro gradiensen szeparált mononukleáris sejteket is használtunk, ekkor a sejtszám 5×10^6 /ml, a tápfolyadék 5 % újszülött borjúsavóval kiegészített Eagle-féle médium, a tenyészetek térfogata 1 ml volt. A kultúrákat 37 °C-on, 5 % CO₂ tenziójú termosztátban inkubáltuk. Amikor "buffy coat"-ból származó NH₄Cl-kezelt leukocytákat alkalmaztunk, akkor 2 mg/ml fehérjetartalmú, humán gammaglobulinmentes szérummal kiegészített MSK-ban a sejtszámot legtöbbször 1x vagy $2,5 \times 10^7$ /ml-re állítottuk, és a 20 ml térfogatú kultúrákat 37 °C-os vízfürdőben 100 ml-es Erlenmeyer lombikban rázattuk, vagy 500-3000 ml térfogatban szintén 37 °C-os vízfürdőben mágnesmaggal kevertettük. A megfelelő inducer hozzáadása és inkubációs idő után a sejtek felülúszóját centrifugálással begyűjtöttük. A mintákat értékmérésig -20 vagy -70 °C-on tároltuk. IFN-gamma termelésére használtunk olyan leukocytákat is, amelyek Sendai vírus inducer hatására előzőleg már IFN-alfát termeltek. Ezeket a sejteket kétszeri mosás után 15 µg/ml Con A-val kezeltük, és további 18-20 órás inkubáció után gyűjtöttük be a felülúszót.



6. Az IFN-gamma tisztítása

6.1. CPG-kromatográfia

A CPG gyöngyöket 8 %-os ammónia oldattal tisztítottuk, ezután a neutrális pH eléréséig mostuk desztillált vízzel, majd PBS-sel. Autoklávban sterilizáltuk (121 °C, 30 perc). Pharmacia K16, vagy K26 jelű oszlopba töltöttük az üveggyöngy szuszpenziót, és PBS-sel equilibráltuk. A tisztítást 4-10 °C hőmérsékletű hidegszobában végeztük. Az IFN-gamma tartalmú felulúszót 50 cm/h lineáris sebességgel perisztaltikus pumpával az oszlopra juttattuk, az oszlopot ezután mostuk PBS-sel, vagy 0,5 M TRIS-HCl (pH 8,5) pufferrel. Az átfolyót ISCO-FOXY Model UA-5 kollektorral gyűjtöttük, és UV monitorral, rekorderrel regisztráltuk a fehérjetartalmát. Az IFN oszlopról való eluálását 10 cm/h lineáris sebességgel végeztük. Etilénglikollt (50 %) és NaCl-ot (1 M) tartalmazó PBS, vagy 1,5 M NaCl-dal kiegészített TRIS-HCl (pH 8,5) puffer volt az eluens. Az etilénglikoll eltávolítására Sephadex G25 gélkromatográfiát alkalmaztunk.

6.2. Gélszűrés Sephacryl S-200 géllal

Pharmacia K16 oszlopba 80 cm magas gélt öntöttünk, amit ezután 5 % etilénglikoll tartalmú PBS-sel equilibráltunk. Az oszlop kalibrálását blue dextran (3 000 kDa) bovin serum albumin (BSA, 67 kDa), ovalbumin (OVA, 45 kDa) és cytochrom C (Cyt C, 13 kDa) molekulású markerek keverékével végeztük. Az oszlop térfogatának 1-2 %-át kitevő mennyiségű mintát 30 ml/óra sebességgel eluáltuk az oszlopról.

6.3. Géliszűrés Ultrogel AcA 54 géllal

Az előre duzzasztott gélből K26 oszlopot töltöttünk a gél desztillált vízes mosása után, majd az equilibráláshoz 1M NaCl-ot tartalmazó PBS oldatot használtunk, a felvitt koncentrált IFN mintát 25 cm/h lineáris sebességgel eluáltuk.

6.4. Az interferonok koncentrálása

A géliszűrés előtt és után az IFN-tartalmú frakciókat Amicon ultraszűrő berendezéssel, YM 10 jelű membránnal koncentráltuk. A membrán a 10 000 Da molekulasúlyú fehérjéket tartja vissza.

7. Az interferonok jellemzése

7.1. PH-érzékenység vizsgálata

Az interferon tartalmú mintákat glycín-HCl pufferben (0,1 M, pH 2) dializáltuk 24 órán keresztül 4 °C-on. Ezután a neutrális pH visszaállítása érdekében PBS-ben dializáltuk a mintákat további 24 órán át.

7.2. Az antivirális aktivitás meghatározása

Mikrotitráló (ún. Linbro) lemezekben tenyésztett sejtekben a fertőzővírus cytopathiás hatásának IFN általi gátlása alapján történt. Ehhez WISH és MDBK sejteket használtunk. A WISH sejt segítségével az IFN-alfa és az IFN-gamma antivirális titere is meghatározható, nem tesz különbséget közöttük. Az MDBK sejtek csak az IFN-alfa antivirális hatására érzékenyek.

A sejtekből lapos aljú 96 lyukas lemezekben tenyészeteket hoztunk létre olyan sejtszámmal ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$), hogy 24 óra múlva a sejtek összefüggő réteget (monolayer) képezzenek. Ekkor a sejtek tápfolyadékát (5 % újszülött borjúsavóval komplettált Eagle-fele médium) lecseréltük tenyészetenként $100 \mu\text{l}$ friss tápfolyadékra. A linbro lemez első lyukába a titrálandó minta megfelelő hígításából szintén $100 \mu\text{l}$ került, és ezután 2-es léptékű hígítási sor készült belőlük Titertek többcsatornás mikropipettával. A hígítási sorból mindig két párhuzamost készítettünk. A mikrotitrátor lemezeket CO_2 termosztátban tartottuk (5 % CO_2 , 37°C). A sejtek tápfolyadékát 18-20 órás inkubálás után eltávolítottuk, és a fertőzővírust (VSV) tartalmazó tápfolyadékra cseréltük ("challenge"). A WISH sejteket 5 PFE/sejt, az MDBK sejteket 0,5 PFE/sejt multiplicitással fertőztük. Újabb 24 órás inkubálás után invert mikroszkóppal vizsgáltuk, hogy milyen mértékben fejlődött ki a cytopathiás hatás az egyes tenyészetekben. Az IFN titere reciproka annak a hígításnak, amely 50 %-ban megvédte a vele kezelt tenyészeteket a vírus cytopathiás hatásától. A két párhuzamos alkalmazása miatt ez egy számított érték volt. Minden mikrotitrátor lemezen ismert titerű standard IFN mintából is készítettünk 2 párhuzamos hígítási sort. A standard IFN minta antivirális titerét nemzetközi standard IFN-alfával (NIH G-023-901-527) összehasonlítva állapítottuk meg. A mintánk titerét úgy számoltuk ki, hogy a minta és a standard 50 %-os védelést biztosító hígítási értékének reciprokából hányadost képeztünk, és megszoroztuk a standard IFN titerével, továbbá ha volt, a minta hígításának mértékével. A titert NE (nemzetközi egység)/ml-

ben adtuk meg. Mivel a kísérletek idején az IFN-gamma nemzetközi standardja nem állt rendelkezésünkre, az IFN-gamma minták titerét E (egység)/ml-ben, az IFN-alfa standardhoz hasonlítva számoltuk ki.

7.3. Az interferonok anticelluláris hatásának vizsgálata

Az interferonok sejtszaporodást gátló hatását K562 és HEp-2 sejteken vizsgáltuk. A 24 órás tenyészetek tápfolyadékát a különféle interferonokat tartalmazóra cseréltük. A K562 sejteket 72, a HEp-2 sejteket 96 óráig tartó inkubálás után számoltuk Bürker-kamrában. Az interferonnal nem kezelt tenyészetek sejtszámához viszonyított sejtszámcsökkenés alapján számítottuk ki a gátlás százalékát. Szignifikáns gátlásnak a 20 %-os redukción tekintettük, mivel az ismételt kísérletek adatai azt mutatták, hogy az értékek szórása 10 %-on belül maradt.

7.4. Az interferonok NK és ADCC aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Ezekben a cytotoxicitási reakciókban effektor sejtként Ficoll-Uromiro gradiensen szeparált humán mononukleáris sejteket alkalmaztunk, a monocytákat plasztikadherenciájuk alapján választottuk el. Az NK lízis targetsejtjei ^{51}Cr izotóppal jelölt K562 sejtek, az ADCC reakció célsejtjei pedig szintén ^{51}Cr izotóppal jelölt csirke vörösvérsejtek voltak, ez utóbbiakat az ellenük nyúlban termelt ellenanyaggal szenzibilizáltuk. Az effektor sejteket 1-18 óráig interferonnal előkezeltük 37°C -on 10 % FCS tartalmú

RPMI tápfolyadékban. A cytotoxikus reakcióban az effektorsejteket a targetsejtekkel 50:1 arányban kevertük össze. A reakcióidő az NK aktivitás vizsgálata esetén 4 óra, az ADCC esetén 18 óra volt. Ezután a sejtek felülúszójának radioaktivitását NK350/A,B típusú gammaszámlálóval mértük, és ez arányos volt a célsejtek pusztulásával. A cytotoxicitási %-ot az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$\text{Cytotoxicitási \%} = (\text{felülúszó cpm} - \text{spontán cpm}) \times 100 / \text{beépült teljes aktivitás cpm}.$$

7.5. Az interferonok "priming" hatásának vizsgálata

NH₄Cl kezeléssel tisztított 1 ml-es leukocytá szuszpenziókat mértünk 24 lyukas (Costar) lemezekbe. Az IFN-alfa termelésekor 1×10^7 /ml, IFN-gamma termelésekor $2,5 \times 10^7$ /ml sejtszámú tenyészeteket készítettünk. Ezeket az előkezelésre szánt interferonok különböző mennyiségeivel IFN-alfa termelésekor 2 óráig, IFN-gamma termelése során 4 óráig kezeltük. A "priming" periódus letelte után kétszer mostuk a sejteket 1000 g-vel 10 percig centrifugálva a lemezeket befogadó speciális rotorban. A sejteket friss tápfolyadékban (2 mg/ml feh. tartalmú MSK) szuszpendáltuk, az inducert (Sendai vírus ill. Con A) hozzáadtuk, és további 18-20 órán át inkubáltuk 37 °C-on CO₂-termosztátban.

8. Fehérjetartalom-meghatározás

Az IFN minták fehérjetartalmát a Bio-Rad fehérjemeghatározó kit segítségével határoztuk meg, standardként 50 µg/ml BSA oldatot használtunk (Bradford, 1976).

9. Az eredmények értékelése

Általában három párhuzamos kísérlet eredményeinek átlagát számoltuk ki, és azt ábrázoltuk a grafikonokon.

EREDMÉNYEK

1. Az IFN-gamma termelése

1.1. Különféle inducerek kipróbálása

Az IFN-gamma előállítása laboratóriumi körülmények között jelentős biológiai aktivitásai miatt fontos feladat. A szakirodalomban leghatásosabbnak tartott indukáló szereket alkalmaztunk Ficoll-Uromiro gradiens centrifugálással szeparált humán fehérvérsejtek kistérfogatú (1 ml-es, stacioner) tenyészetének IFN-gamma termeléséhez.

Az 1. ábra adatai mutatják, hogy a leghatékonyabb kombináció a TPA és az A23187 ionophore együttes alkalmazása, mégpedig az 5 ng/ml TPA koncentráció mellett adott 0,5 μ M ionophore. A TPA önmagában nem idézte elő IFN-gamma termelését, az ionophore-val együtt azonban annak szűk koncentrációtartományában (0,2-1 μ M) jelentős titerű IFN-gamma produkciót váltott ki.

A Con A indukálta IFN-gamma termelést a TPA fokozta, ez a fokozás kifejezettebb volt akkor, ha a TPA-val a sejteket 24 órán át előkezeltük. A sejtek ezt követően Con A-val történő 1 napig tartó inkubálása eredményezett optimális IFN-gamma hozamot (2. ábra).

Vizsgáltuk, hogy a Con A hatására termelődött IFN-gamma mennyiségét a fehérvérsejtek IFN-nal történő előkezélése milyen módon befolyásolja. Az előkezelésre használt IFN-alfát az inducer (Sendai vírus) hatástalanítása céljából savas pH-jú (pH 2) pufferrel 24 órán át kezeltük. Bebizonyosodott, hogy mind IFN-alfával, mind

IFN-bétával előkezelve a sejteket jelentős mértékben növelhető a termelődő IFN-gamma mennyisége. Tehát a "priming" jelensége megfigyelhető az IFN-gamma esetében is. A termelés maximális (kb. 10-szeres) fokozásához az IFN-alfa termelésénél tapasztaltaktól eltérően (200 NE/ml IFN-alfával való előkezelésre termelődött a legtöbb IFN-alfa) igen nagy mennyiségű IFN-alfa, vagy IFN-béta (3000 NE/ml) szükséges (3. ábra). Az inducer hozzáadása előtt az előkezelésre használt IFN-t a sejtek mosásával eltávolítottuk.

1.2. Az IFN-gamma azonosítása

A leírt módon nyert IFN stabilitását jellemeztük kétféle hőmérsékleten (37 °C és 56 °C) és pH 2-n való tárolás után (4., 5., 6. ábra). Összehasonlítottuk az IFN-gammát az IFN-alfával és IFN-bétával, hogy antivirális aktivitásuk milyen módon változik hő és savas pH hatására. Az IFN-bétát találtuk a leglabilisabbnak, az IFN-alfa csak közel 1 órás 56 °C-os tárolás után veszített jelentősen az aktivitásából. Az IFN-gamma érzékenységet illetően mindkét esetben köztes helyet foglalt el a két másik IFN között. Az IFN-gamma 56 °C-on 30 perc után aktivitásának 80 %-át elveszítette. PH 2 kezelésre az IFN-alfa-"priming" alkalmazásával előállított IFN-gamma nagyfokú érzékenységet mutatott, a másik két IFN stabil maradt. Ezek a tulajdonságok megegyeznek az IFN-gammára elfogadottakkal az irodalomban.

1.3. Az IFN-alfával előkezelt leukocyták Con A-val indukált IFN-gamma termelésének optimalizálása

Mivel ez a laboratóriumi körülmények között megfigyelt

IFN-gamma termelési mód az alkalmazott anyagok veszélytelensége (TPA-mentesség) miatt alkalmasnak látszott nagy térfogatú, klinikai célra felhasználható IFN-gamma előállítására, célul tűztük ki az indukciós körülmények részletesebb vizsgálatát.

A termelés fázisait sorba véve igyekeztünk optimalizálni annak körülményeit. Erre a célra "buffy coat"-ból származó, NH_4Cl -kezeléssel vvt-mentesített leukocytá szuszpenziót, 1×10^7 sejtszámot, és a humán leukocytá IFN gyártása során szerzett tapasztalatok alapján gammaglobulinmentes humán szérumot tartalmazó MSK tápfolyadékot használtunk.

Az előzőekben bemutatott eredmények alapján 3000 NE/ml IFN-alfát "priming"-ként alkalmazva vizsgáltuk az IFN-alfa előkezelés időtartamának hatását a termelődött IFN-gamma mennyiségére (7. ábra).

A termelés szempontjából nem közömbös az alkalmazott inducer mennyisége. A Con A koncentrációját emelve az IFN-nal előkezelt kultúrákban a $15 \mu\text{g/ml}$ inducerkoncentráció mutatkozott optimálisnak (8. ábra).

Az IFN-gamma termelődésének kinetikáját vizsgálva megállapítottuk, hogy az IFN-gamma mennyisége az inkubáció 12. órájában éri el a maximumot, és ezt követően lassan csökken (9. ábra). A "priming" hatás megmutatkozott abban, hogy az IFN-gamma titere korábban kezdett emelkedni, és végig magasabb szinten maradt, mint az előkezeletlen tenyészetekben.

Az eddig leírt kísérletekben a sejttenyészetek sejtszáma $1 \times 10^7/\text{ml}$ volt. Az IFN-alfa termelése során ez az optimális. Kipróbáltuk, hogy más sejtkoncentráció alkalmazásával elérhető-e na-

gyobb IFN-gamma hozam. Adataink szerint a sejtszám növelésével olyan mértékű volt a titeremelkedés, hogy a termelődött IFN mennyisége nemcsak abszolút értékben nőtt, hanem a 10^7 sejtre átszámított relatív termelés is fokozódott (10. ábra). Tehát gazdaságossági szempontból is indokolt volt a magasabb sejtszám alkalmazása. Az IFN-hozam maximumát $3,5 \times 10^7$ sejt/ml esetében figyeltük meg.

1.4. A nagybani IFN-gamma termelés optimalizálása

Az IFN-gamma laboratóriumi méretekben való termelésének eredményei alapján vizsgáltuk a nagybani előállítás lehetőségeit. A nagyítási kísérleteket a rendelkezésre álló "buffy coat" mennyiségtől függően 500, 2000 vagy 3000 ml -es térfogatban végeztük. Az 500 ml-es mintatérfogat esetén a sejteket 1000 ml-es transzfúziós palackokban kevertettük, a 2-3000 ml-es térfogatú kultúrákat 6000 ml-es gömblombikban szárnyasmágnessel keverve tartottuk szuszpenzióban.

Első lépésként megvizsgáltuk, hogy érvényes-e nagy térfogatban is a kis volumenben megállapított sejtszámfüggés. A rendelkezésre álló fehérvérsejt mennyisége a $2,5 \times 10^7$ sejt/ml sejtszámnál nagyobb koncentrációt nem tette lehetővé, de az ezzel elért IFN-gamma hozam megközelítette a kis térfogatban megfigyelt maximumot (10. ábra). A $2,5 \times 10^7$ sejt/ml sejtkoncentráció alkalmazása mellett döntöttünk, annál is inkább, mert a koncentráltabb fehérvérsejt szuszpenzió pH-ja nem stabilizálható nagy térfogatban, erősen eltolódik a savanyú pH felé.

Ellenőriztük a "priming" hatásosságát nagy térfogatban, és azt, hogy az MSK-hoz képest komplettebb Eagle-féle médium alkal-

mazása nem előnyösebb-e $2,5 \times 10^7$ sejtszámnál. A VI. táblázatban feltüntetett adatok szerint a "priming" hatásos, és az MSK ilyen körülmények között is egyenértékű az Eagle-féle tápfolyadékkal.

VI. táblázat

TERMELÉS NAGY TÉRFOGATBAN

	Priming	
	-	3000 NE/ml IFN-alfa
IFN-titer (E/ml)	420 (100%)	4710 112%

	Tápfolyadék	
	Eagle-féle	MSK
IFN-titer (E/ml)	5040 (100%)	5130 (101,8%)

A "priming" optimális időtartama nagy volumenű termelés esetében is 4 óra volt (11. ábra).

Az inducer mennyiségét vizsgálva megállapítható, hogy 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció alkalmazása eredményezi a legnagyobb IFN-gamma titert, ha $2,5 \times 10^7$ sejtszámú, nagy térfogatú a tenyészet (12. ábra).

A 13. ábra a $2,5 \times 10^7$ sejt/ml sejtszám és 3000 ml-es térfogat alkalmazásakor tapasztalt IFN-gamma termelődés kinetikáját mutatja be. Az inkubáció 12. órájában már igen magas a tenyészetben az IFN-gamma titer.

A fentiek alapján az IFN-gamma nagy volumenben való előállítására a következő körülmények az optimálisak: 4 óráig tartó, 3000 NE/ml IFN-alfával való előkezelés, 15 ug/ml (gazdaságossági szempontból) Con A hozzáadása a 3000 ml-es $2,5 \times 10^7$ sejt/ml sejtszámú kultúrához. Tápfolyadékként 2mg/ml-es fehérjetartalmú humán gamma-globulinmentes szérumot tartalmazó MSK-t használtunk. A módszerrel átlagban 1500-3000 E/ml titerű IFN-gamma nyerhető.

2. IFN-gamma termelése IFN-alfát már termelt sejtek szuszpenziójában

Az IFN-gamma nagybani előállítása az előző fejezetben leírt módon igen nagy sejtmennyiséget igényel. Ez a tény felvetette annak szükségességét, hogy takarékosabb eljárás kidolgozásával próbálkozzunk.

A SZOTE Mikrobiológiai Intézetében korábban IFN-alfa termelésére leírt eljárás alkalmazásakor felhasznált sejteket újból IFN-produkcióra készítettük.

Az IFN-alfát és IFN-gammát termelő sejtek nem ugyanazok. A 3. ábrán látható, hogy igen nagy mennyiségű IFN-alfa, ha nem is maximálisan, de a kontollhoz képest fokozta a sejtek IFN-gamma termelését Con A hatására. Feltételeztük, hogy a kb. 16 óráig tartó magas titerű IFN-alfával való előkezelés nem gátolja meg, hogy Con A indukcióra az IFN-gammát termelő lymphocyták reagáljanak.

Laboratóriumi méretekben végzett kísérletek eredményeit foglalja össze a VII. táblázat.

VII. táblázat

IFN-ALFA TERMELÉST KÖVETŐ IFN-GAMMA ELŐÁLLÍTÁS

Tápfo- lyadék	IFN-alfa termelés (0-20 h)			Mosás	IFN-gamma termelés (20,5-40 h)		
	0-2 h priming 200 NE/ml	2 h Sendai vírus	20 h titer NE/ml		20,5 h Con A	21 h titer NE/ml	40 h titer E/ml
MSK	+	+	56000 43000	+	+	573 656	3278 2459
Eagle-f.	+	+	78000 52000	+	+	819 737	3688 4918
MSK	+	+	56000 48000	+	-	655 650	2049 1639
Eagle-f.	+	+	52000 65000			573 491	1126 1436
MSK	-	-	NT ^x	+	+	102 82	409 409
Eagle-f.	-	-	NT	+	+	82 82	420 390

x= nem tesztelve

Bemutatja a két egymást követő termelési szakasz időrendjét. A bal oldalán lévő oszlopokban az IFN-alfa termelési periódusban mért titerek láthatók. "Priming"-ot és Sendai vírussal való fertőzést követően 40-70000 NE/ml titerű IFN-alfa képződik. Amint az az IFN-gamma előállításának leírásában szerepel, az előkezelésre használt IFN-alfát, - itt az első periódusban termelődött nagy titerű IFN-alfát kétszeri mosással eltávolítottuk. Az IFN-alfa termelő szakaszban a sejtkoncentráció 1×10^7 sejt/ml. A fentiekből látható, hogy az IFN-gamma termelésének sejtigénye nagyobb. Ezért a mosás végén $2,5 \times 10^7$ -re állítottuk a sejtszámot. Az inducer dózisa ebben az esetben is 15 μ g/ml volt. Hogy megtudjuk, a mosást követően a sejtszuspenzió mennyi IFN-t tartalmaz, fél óra elteltével mintát vettünk, és meghatároztuk az antivirális aktivitását. Ez mutatja a maradék IFN-alfa tartalmat, ami kb. 1% (500-800 NE/ml). Con A hozzáadása nélkül is inkubáltunk tenyészeteket az IFN-gamma termelés végéig. A mért titerek mutatják, hogy a sejtek továbbra is kibocsátanak kis mennyiségű IFN-alfát. Tehát ez jelzi, hogy a Con A indukció után nyet IFN tartalmaz IFN-alfát. A sejtek IFN-gammát termelő képességének vizsgálata céljából "priming" és Sendai vírus nélkül is tenyésztettünk sejteket, amelyeket mosás után Con A-val kezeltük. A fél óra múlva kimutatott IFN-tartalom eredete és minősége nem tisztázott. A 19 óra elteltével meghatározott IFN-gamma titer alacsony, de megfelel az IFN-alfával nem kezelt sejtek termelőképességének. Látható, hogy az előzőleg IFN-alfát termelt sejtek felülúszójában a Con A hatására magasabb, 2500-5000 E/ml titerű IFN képződött. Ez az aktivitás pH 2 kezelés hatására a Con A-val

nem kezelt sejtek által termelt IFN-alfa titerének megfelelő értékre csökken. A pH 2 érzékeny rész az IFN-gamma tartalmat jelzi.

A kísérleteket MSK és Eagle-féle tápfolyadék alkalmazásával is elvégeztük, és a tapasztalt különbséget nem találtuk jelentősnek.

Mivel az irodalomból ismert, hogy az I típusú és II típusú IFN-ok fokozzák egymás antivirális aktivitását (Fleischmann és mtsai, 1979), és olyan sejtvonal nem ismeretes, amelyben csak az IFN-gamma hoz létre antivirális állapotot, ezért módszert kerestünk a keverék preparátumok IFN-gamma tartalmának meghatározására. Vizsgáltuk különböző arányban összekevert 1×10^6 NE/mg fehérje specifikus aktivitású tisztított IFN-alfa és 1×10^5 E/mg fehérje specifikus aktivitású IFN-gamma minták antivirális aktivitását. A 14. ábra szemlélteti, hogy a vizsgált keverék titere meghaladja az additív értéket, és több, mint kétszeres titeremelkedés is kimutatható. Az itt bemutatott eredményeket alapul véve létrehoztunk egy olyan kalibrációs görbét, amelyen 1:9-30:1 arányú ismert titerű IFN-gamma és IFN-alfa keverékekhez tartozó fokozás mértékét ábrázoltuk logaritmusban (15. ábra). Az IFN-alfát és IFN-gammát ismeretlen arányban tartalmazó előzőleg Sendai vírussal majd Con A-val kezelt sejtek felülúszójában az IFN-gamma tartalom úgy határozható meg, hogy a minta antivirális aktivitását meghatározzuk pH 2 kezelés előtt és után. A két érték hányadosának logaritmusa meghatároz egy pontot a kalibrációs görbén. A pontot az x tengelyre vetítve a pH 2 kezelt minta titerének segítségével az IFN-gamma tartalom kiszámolható.

Az IFN-gamma IFN-alfát követő nagy volumenű előállítására az adott lehetőséget, hogy ekkor már az EGIS Gyógyszergyárban folya-

matos IFN-alfa termelés folyt. IFN-alfát termelt két 3000 ml térfogatú fehérvérsejt szuszpenzió sejtjeit egyesítettük alacsony fordulátú, szobahőmérsékleten történő centrifugálással. A sejteket kétszer mostuk előmelegített gammaglobulinmentes szérumot nem tartalmazó MSK-val, majd 2400 ml térfogatú szuszpenziót készítettünk a sejtekből, így az eredeti 1×10^7 sejt/ml sejtszám $2,5 \times 10^7$ sejt/ml-re növekedett. A VIII. táblázat 5 különböző alkalommal végzett kísérlet eredményét foglalja magába. A tápfolyadék fehérjetartalmának csökkentésével a képződött IFN-gamma mennyisége is kevesebb lett, ezért a 2 mg/ml fehérjetartalom alkalmazása mellett döntöttünk. Gammaglobulinmentes humán szérumot használtunk. A táblázatban feltüntetett IFN-gamma titereket a kalibrációs görbénk segítségével számoltuk ki.

VIII. táblázat

NAGY TÉRFOGATÚ, IFN-ALFA TERMELÉS UTÁNI IFN-GAMMA TERMELÉS

Fehérje tart.(mg/ml)	Kísérlet száma	IFN-alfa+gamma titer (NE/ml)	IFN-gamma ^x titer(E/ml)	Átlag IFN-gamma titer (E/ml)
2	1.	7800	2290	4091 (100%)
	2.	18880	6570	
	3.	16860	7217	
	4.	4770	817	
	5.	16858	3563	
1	1.	7020	1530	3220 (72%)
	2.	22450	7250	
	3.	10930	3800	
	4.	4730	761	
	5.	14166	2763	
0,5	1.	3900	970	1004 (24%)
	2.	-	-	
	3.	2890	710	
	4.	3990	367	
	5.	9192	1969	

x= kalibrációs görbével kiszámítva

3. Az IFN-gamma tisztítása

A klinikai gyakorlatban felhasználható interferonok specifikus aktivitása minimálisan 1×10^6 NE/mg protein. Ezt a tisztaságot igyekeztünk elérni az IFN-gamma és az IFN-alfa termelést követően előállított IFN-gamma tisztítása során. Mivel a kiindulási anyag specifikus aktivitása igen alacsony volt, ezért a tisztítást több lépésben végeztük. A folyamat fázisait a 16. ábra szemlélteti. Az IFN-tisztítására jól alkalmazható CPG 75 adszorpciós oszlopkromatográfiát választottuk első lépésnek. Ez a gélagy szelektíven kötötte meg a rávitt IFN csaknem teljes mennyiségét, az átfolyóban mindössze 1-5% IFN-t lehetett kimutatni. Az IFN-t tartalmazó oszlopot mostuk. Ehhez PBS-t, vagy 0,5 M TRIS-HCl puffert (pH 8,5) alkalmaztunk. Mindkét módszer jelentősebb IFN-veszteség nélkül további tisztulást eredményezett a gyengén kötődött szennyező fehérjék eltávolításával. Az IFN gélről való eluálására kétféle módszert is kipróbáltunk, ez az irodalomból ismert 50 % etilénigollt és 1 M NaCl-t tartalmazó PBS-oldattal (de Ley és mtsai, 1980.), vagy az IFN-alfa tisztítása során használt 1,5 M NaCl-dal kiegészített 0,5 M TRIS-HCl pufferrel (pH 8,5) történt. Mindkét módszer alkalmazása esetén a visszanyerés 50-60 % volt, a tisztulás pedig 20-30-szoros. A CPG-eluátum IFN-tartalmának specifikus aktivitása az ún. semi-crude tisztasági fokot érte el (16. ábra, A rész). Következő lépésként géliszűrést végeztünk, amely a molekulasúly szerinti elválasztás révén további tisztulást eredményezett. A géliszűrés előtt szükséges volt a CPG-eluátum ultraszűréssel való koncentrálása. Az Ultrogel Aca 54 oszlopról 1 M NaCl-t tartalmazó PBS-sel eluáltuk a

felvitt IFN-t. A Sephacryl S-200 gélen történő kromatografáláskor eluensként 5 % etilén-glikollal tartalmazó PBS-t használtunk. A gél-szűrés során az IFN meghígul, és így a folyamat végén a megfelelő titer elérése céljából újbóli ultraszűrés szükséges az IFN koncentrálására, és ez egyben a minta sómentesítését is megoldja. A fent leírt kromatográfiás eljárások jó visszanyeréssel részlegesen tisztított, megközelítőleg 1×10^6 E/mg fehérje tisztaságú IFN-gammát eredményeztek.

Az Ultrogel Aca 54 kromatográfiát az IFN-alfa termelés utáni IFN-gamma tisztítására alkalmazva a 17. ábrán látható elúciós profilt kaptuk. A szürke oszlopok a frakciók WISH sejten mért antivirális aktivitását mutatják. A titerek IFN-alfa+IFN-gamma együttes aktivitását képviselik. A fekete oszlopok az MDBK sejten mért titert jelzik. Ez a sejtvonal az IFN-gammára nem érzékeny, csak az IFN-alfa tartalom mérhető vele. A bejelölt frakciók olyan mennyiségű IFN-alfát tartalmaznak, amely már nem eredményezi fokozott antivirális titer kialakulását, és az itt mért aktivitások a frakciók IFN-gamma tartalmának tulajdoníthatók.

A Con A indukálta IFN-gamma molekulásúlyának meghatározása céljából molekulásúly markerekkel kalibrált Sephacryl S-200 oszlopon végeztük a CPG-tisztított IFN-gamma gél-szűrését. WISH sejteken egy alacsonyabb (23 kDa) és egy magasabb (51 kDa) molekulásúlyú antivirális aktivitással rendelkező "peak"-et mutattunk ki. Ezek az IFN-gamma monomer és dimer formájának megfelelő értékek (18. ábra).

4. Az IFN-gamma biológiai aktivitásai

A fenti módon előállított IFN-gamma különféle biológiai hatásait vizsgáltuk összehasonlítva az IFN-alfa és/vagy IFN-béta ezen hatásaival.

Mindhárom IFN típus sejtszaporodást gátló hatását tanulmányoztuk HEp-2 sejteken. Az irodalmi adatoknak megfelelően ugyanolyan mértékű (20 %) szaporodásgátlás létrehozásához az IFN-gammából lényegesen kisebb mennyiség is elegendő volt, mint az IFN-alfából, vagy IFN-bétából (19. ábra). A K562 humán erythroid leukaemia sejtvonalon még kifejezettebben megfigyelhető volt az IFN-gamma IFN-alfához viszonyított erőteljesebb anticelluláris hatása (20/a és b ábra). Az antivirális titer alapján meghatározott mennyiségeket alapul véve az IFN-gamma HEp-2 sejten megközelítőleg 1 nagyságrenddel, K562 sejten 3 nagyságrenddel volt hatásosabb, mint az IFN-alfa vagy IFN-béta. A kísérletekben használt IFN-gamma 1×10^5 E/mg protein az IFN-alfa és béta 1×10^6 NE/mg protein specifikus aktivitású volt.

Ismeretes, hogy az IFN előkezelés hatására fokozódik a természetes ölüsejtek cytotoxikus aktivitása. Vizsgálataink szerint nyers IFN-gamma (specifikus aktivitása: 1×10^3 E/mg protein) jelentős, kb. 20 %-os fokozást eredményez a szeparált humán lymphocyták cytotoxicitásában, és ez a hatás kis antivirális aktivitású IFN-gammával elérhető (21. ábra). A nyers IFN-alfát (specifikus aktivitása: 3×10^4 NE/mg protein) ennél kevésbé hatásosnak találtuk.

Az antitestfüggő celluláris cytotoxicitás (ADCC) az előbb említett tisztítatlan IFN-ok általi fokozását mutatja a 22. ábra. Az

IFN-gamma e tekintetben is hatékonyabbnak mutatkozott mint az IFN-alfa.

Összehasonlítottuk tisztított készítmények, 1×10^6 NE/mg protein specifikus aktivitású IFN-alfa és 1×10^5 E/mg protein specifikus aktivitású IFN-gamma NK és ADCC aktivitást moduláló hatását. 200 NE v. E/ml IFN-alfa és IFN-gamma közel azonos stimuláló hatást fejtett ki (IX. táblázat). Tehát a nyers preparátumok esetében megfigyelt különbség itt nem alakult ki.

IX. táblázat

TISZTÍTOTT IFN-ALFA ÉS IFN-GAMMA HATÁSA AZ NK ÉS ADCC AKTIVITÁSRA

Effektor	Cytotoxicitási %			
Előkezelés	NK		ADCC	
200 NE/ml				
	<u>1 óra</u>	<u>18 óra</u>	<u>1 óra</u>	<u>18 óra</u>
-	52	41	50	39
IFN-alfa	94	71	86	69
IFN-gamma	90	64	85	66

Az interferonok "priming" hatása érvényesül IFN-alfa és IFN-gamma termelődése során. Az IFN-alfát termelő sejtek produkciója fokozható nemcsak IFN-alfával és bétával, hanem IFN-gammával is. Az IFN-gamma azonban kisebb mértékű fokozást vált ki. Az IFN-alfa és béta 100-300 NE/ml-ével való előkezelés eredményezte az IFN-alfa termelésében a maximális, kb. 2-szeres növekedést, ehhez közelítő hatást 10-15-ször több IFN-gamma váltott ki (23/a ábra). Az IFN-gamma termelés is fokozható a sejtek indukció előtti IFN-kezelésével, mint azt már a 3. ábrán bemutattuk. Kétszeres termelésfokozást már kis mennyiségű IFN-alfa/béta kiváltott, 1000-3000 NE/ml-rel történő előkezelés közel 40-szeres titeremelkedést okozott. A 23/b ábrán látható, hogy az IFN-gamma előkezelés is növelte a képződött IFN-gamma mennyiségét, de az IFN-alfa/bétánál kevésbé hatásosan.

Több szerző beszámolt arról, hogy az I típusú és II típusú IFN-ok fokozzák egymás antivirális aktivitását, leírták az anticelluláris és NK aktivitást fokozó hatásuk kölcsönös növelését is. Ezért tanulmányoztuk, hogy az IFN-alfát és IFN-gammát tartalmazó kevert preparátumok hatásosabbak-e akár az IFN-alfa (24/a ábra), akár az IFN-gamma (24/b ábra) termelésének fokozásában. Az ábrákon látható, hogy az IFN-gamma nem tudta az IFN-alfa által létrehozott termelésnövekedést tovább fokozni. Bár ezek keverékének antivirális aktivitásában jelentős titeremelkedést tapasztaltunk az additív értékhez képest, a "priming" terén ilyen kölcsönhatást nem tudtunk kimutatni.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Az IFN-gamma, amely keletkezését mitogének és antigének indukálják T lymphocytákban, rendelkezik azon biológiai aktivitásokkal, amelyekkel az IFN-alfa és IFN-béta. Ezek az antivirális hatás és sejtszaporodást gátló hatás, és lényeges szerepük van a szervezet védekező mechanizmusainak modulálásában, hatnak az immunrendszer működésére. Megfigyelték, hogy az IFN-gamma sejtszaporodást gátló aktivitása fokozottabb, mint az IFN-alfáé; az immunmoduláns hatásai között az MHC antigének kifejeződésének fokozása az I típusú IFN-októl eltérően az MHC II osztályú antigénekre is kiterjed.

Gyakran leírták, hogy az IFN-gamma és az IFN-alfa/béta több biológiai aktivitás tekintetében fokozza egymás hatását (Fleischmann és mtsai, 1979; Oleszak és Stewart, 1985; Weigent és mtsai, 1983). Tulajdonságaik megfelelő tiszta formában való vizsgálata és klinikai alkalmazhatóságuk érdekében szükség volt nagymennyiségben való előállításukra és tisztításukra. A természetes IFN-alfa esetében az ilyen igényeket kielégítő termelés módja főleg K. Cantell úttörő munkája eredményeképpen kidolgozott. A SZOTE Mikrobiológiai Intézetében is ebből a módszerből kiindulva készült szabadalmi eljárás terápiás célokra alkalmazható természetes humán leukocyta IFN előállítására. Az IFN-gamma ilyen célokat szolgáló preparátumként való előállítása azért jelentett nehezebb feladatot, mert az IFN-gamma az IFN-alfához képest igen kis mennyiségben keletkezik a különféle inducereket hatására. Célunk volt magasabb titerű, tisztításhoz jobb kiindulási anyag előállítása. Braude leírását követve

TPA-val és A23187 ionophore alkalmazásával megfelelő titerű IFN-gammát tudtunk előállítani. A Con A indukálta IFN-gamma képződését is fokozni tudtuk TPA-val. A TPA alkalmazását azonban elvetettük karcinogén hatása miatt. Kimutatták, hogy a Con A stimulusra termelődött leukocita migrációt gátló faktor (LIF) mennyisége fokozható IFN-alfa előkezeléssel (Dinh és mtsai, 1980), és ezen sejtek felülúszójában az IFN-gamma tartalom is nőtt. Wiranowska-Stewart és mtsai (1980) szerint 100 NE/ml IFN-alfa előkezelés csak kismértékű fokozást eredményezett az IFN-gamma termelésében. Mi szélesebb koncentrációtartományt vizsgálva megállapítottuk, hogy viszonylag magas IFN-alfa/béta dózis (1000-3000 NE/ml) kb 10-szeresre növeli a Con A indukálta IFN-gamma mennyiségét. Az indukciós körülmények további javítása céljából meghatároztuk a legmegfelelőbb előkezelési időtartamot (4 h), induceraldózt (15 µg/ml Con A), sejtkoncentrációt ($2,5 \times 10^7$ sejt/ml), és vizsgáltuk a termelés kinetikáját, ami azt mutatta, hogy rövid, akár 12 órás inkubáció is elegendő a legmagasabb titer eléréséhez. A keletkezett IFN fizikokémiai tulajdonságai: pH 2-érzékenysége és labilitása 56 °C-on az IFN-gamma jellegzetességei.

Az IFN-gamma nagytérfogatban való előállítása a kis volumenű termeléskor tapasztaltak alapján indult, és a paraméterek ilyen körülmények közötti vizsgálata szerint lényeges változtatásukra nem volt szükség. Az olcsó és egyszerű, vitaminokat és aminosavakat nem tartalmazó MSK tápfolyadék, amelyet a nagybani IFN-alfa termelés során használtak (Tóth és mtsai, 1984), itt is alkalmasnak bizonyult 2 mg/ml fehérjetartalommal.

A természetes IFN előállításának legnagyobb akadálya az, hogy a fehérvérsejtek nem állnak rendelkezésre korlátlan mennyiségben. A leukocyta IFN (IFN-alfa) üzemi előállítása, amely kísérleteink idejében már folyamatos volt az EGIS Gyógyszergyár interferont gyártó üzemében, a beszerezhető "buffy coat" nagy részét felhasználta. Az IFN-gamma gyártás lehetőségének megteremtéséhez - a nagy sejtszükséglete miatt is - a módszert olyan tekintetben módosítottuk, hogy megpróbáltuk újra felhasználni az IFN-alfát már termelt leukocytákat. Ismereteink szerint a fő IFN-alfát termelő sejtek nem azonosak az IFN-gammát produkálókkal, tehát termelőképességüket megőrizhették. Az is ismeretes, hogy a magas titerű IFN-nal való előkezelés a sejtek indukcióra adott válaszát gátolja, az ún. "blocking" jelensége lép fel (Golgher és mtsai, 1973). A mi kísérleteink során azonban a sejteket körülvevő közeg IFN-alfa tartalma nem gátolta a Con A indukálta IFN-gamma produkciót, sőt a "priming" hatás érvényesült inkább. Ez abból is sejthető volt, hogy az IFN-alfával "priming"-olt IFN-gamma keletkezését még 5×10^4 NE/ml IFN-alfa sem csökkentette az előkezeletlen szintjére, és Sendai vírus hatására az első termelési periódusban is kb. ennyi IFN-alfa termelődik. Így alkalmasnak találtuk a sejteket arra, hogy ismételtén felhasználjuk őket, és IFN-gammát termeljünk velük. Eredményeink azt mutatják, hogy a sejtek továbbra is termelnek IFN-alfát, és mint tudjuk, az IFN-gamma és IFN-alfa keverék antivirális aktivitása nem tükrözi az igazi IFN tartalmat. Olyan módszerre volt szükség, amelynek segítségével meghatározható az elegy IFN-típus összetétele. Az IFN-gamma pH 2-érzékenysége lehetővé teszi az IFN-

alfa mennyiségének titrálását, de az IFN-gamma titert csak egy olyan kalibrációs görbe segítségével határozhattuk meg, amelyet általunk készített keverékek fokozott és pH 2-kezelt titere alapján alakítottunk ki. A kalibrációs görbével számolva a nagytérfogatú IFN-alfa termelést követően előállított IFN-gamma titere 1000-7000 E/ml között volt. A kidolgozott üzemi méretekben alkalmazható eljárás alapján az ÉGIS Gyógyszergyár interferont gyártó üzemében elkezdődött az IFN-gamma előállítása.

Az IFN-gamma tisztítása a kiindulási nyers IFN alacsony specifikus aktivitása miatt többlépéses eljárást igényel. A kontrollált pórusú üveggyöngy használatát interferon tisztítására először Edy és mtsai írták le 1976-ban, de ezt követően több laboratóriumban is felhasználták, mert az interferonokat a többi fehérjéhez képest szelektíven, nagy affinitással adszorbeálja. Az IFN-alfa tisztítása üzemi méretekben az ÉGIS Gyógyszergyárban is ezzel a módszerrel történik. Az IFN-gamma tisztításakor több laboratóriumban a CPG-kromatográfia az első koncentrációt és tisztítást szolgáló eljárás. Tisztítási kísérleteinkben alkalmazva az IFN-gammát 100%-ban megkötötte a CPG, a szennyező fehérjéknek csak egytizedét. Az IFN-gamma adszorbensről való eluálására többféle elúciós módot leírtak: pl. a 20-50 % etilén-glikollal tartalmazó foszfát-puffert, Chadha és Sulkovski (1982) pedig a magas molaritású elektrolitokat is alkalmasnak találta erre a célra. A SZOTE Mikrobiológiai Intézetében Mécs Imre dolgozott ki eljárást az IFN-alfa tisztítására, amely során eluensként magas (1,5 M NaCl) só-tartalmú TRIS-HCl-puffert (pH 8,5) alkalmazott. Összehasonlítottuk az etilén-glikollal

alkalmazó elúciós eljárást a NaCl tartalmú TRIS-HCl pufferrel történő elúcióval. Az utóbbi eluenssel jobb, megközelítőleg 50-szeres tisztulást értünk el, az eluátum specifikus aktivitása $1-2 \times 10^5$ E/mg prot. lett, ami már semi-crude minőséget jelent. A részlegesen tisztítottnak mondott minőség elérése érdekében a további tisztítás gélszűréssel történt. Ez is gyakran alkalmazott módszer az IFN-gamma tisztítására. Jó kitermelést biztosított, és a specifikus aktivitás is megközelítette a kívánt 1×10^6 E/mg prot. értéket. Az IFN-alfa termelést követően előállított IFN-gamma esetében a CPG kromatográfia során sem hagytuk figyelmen kívül a titerek fokozott voltát, a visszanyerés kiszámolásakor a PH 2-kezelt minták titerét és a kalibrációs görbét használtuk fel.

A gélszűrés hasznos módszer volt azért is, mert az IFN-gamma és IFN-alfa elválasztását ezzel sikerült megoldani. A kisebb molekulású IFN-alfa később eluálódik, mint a két helyen is glikozilált és gyakran dimer formában előforduló IFN-gamma. Az IFN-gamma molekulásúlyának meghatározása során megfigyeltük egy nagyobb és egy kisebb molekulású komponens elválását. Egyik csúcs frakciói sem mutattak antivirális aktivitást a csak IFN-alfára érzékeny MDBK sejteken, ami arra utal, hogy a dimer és monomer IFN-gamma molekulaforma vált el a gélben. A neutrális pH-n (itt PBS-t alkalmaztunk eluensként) az IFN-gamma leginkább dimer formában található meg (Trotta és Nagabhushan, 1992).

Az előállított IFN-gamma biológiai hatásait az I típusú interferonokéval összehasonlítva vizsgáltuk. Leírták, hogy az interferonok biológiai aktivitásaiban általában csak kvantitatív különbség

fedezhető fel, mert legtöbb hatás kiváltható mindegyik típussal, csak a hatásos, antivirális aktivitás alapján meghatározott dózis nagysága tér el. Az interferonoknak az a tulajdonsága, hogy tumor-sejtek szaporodását képesek gátolni nagy reményeket ébresztett az IFN-ok daganatterápiában való alkalmazhatósága tekintetében. Az IFN-gamma iránti érdeklődés is fokozódott, amikor leírták, hogy az IFN-alfa/bétánál kifejezettebb az antiproliferatív aktivitása.

Kísérleteinkben két sejtvonalon is kimutattuk ezt a hatékonyságbeli különbséget. Bár irodalmi adatok szerint a különféle sejtvonalak IFN-ra és IFN típusra való érzékenysége nagyon eltérhet egymástól.

A természetes cytotoxicitásnak fontos szerepe van a malignus és vírusfertőzött sejtek eliminálásában. Az interferonok in vivo antitumor hatásához hozzájárul a természetes ölüsejtek aktivitásának fokozása.

A nyers IFN-alfa és IFN-gamma preparátumokat összehasonlítva az IFN-gamma itt is hatásosabbnak látszott. A kísérleteket tisztított IFN-okkal elvégezve azonban a két IFN-típus egyforma hatásúnak bizonyult. Ezt tapasztalták de Ley és mtsai is (1980). Feltételezhető, hogy a cytotoxikus reakciók fokozásáért a tisztítatlan készítményekben jelenlévő egyéb cytokinek a felelősek, és ezek a tisztítás során eliminálódnak. Az irodalomban ebben a témában is előfordulnak ellentmondásos adatok, hiszen Weigent és mtsai (1983) szerint rekombináns IFN-gamma 50-szer hatékonyabban fokozta az NK sejtek aktivitását, mint a rekombináns IFN-alfa és béta. Ezek a szerzők számolnak be arról, hogy az IFN-gamma szinergizálja a má-

sik két IFN típus NK sejt aktiválását. Tehát ezen a téren is megfigyelhető a szinergizmus, ami az antivirális aktivitás terén jól jellemzett.

Megállapítottuk, hogy mindhárom IFN típus rendelkezik azzal a képességgel, hogy előkezelésként alkalmazva őket fokozzák a Sendai vírus indukálta IFN-alfa és a Con A indukálta IFN-gamma termelést, és az IFN-gamma mindkét termelő rendszerben alulmaradt hatékonyságban az I típusú IFN-okkal szemben. Tanulmányoztuk azt is, hogy az egyéb biológiai aktivitásokhoz hasonlóan a kevert IFN-alfa+gamma preparátumok effektívebbek-e az IFN termelés fokozásában, mint az egyféle IFN-t tartalmazók. Eredményeink azt mutatják, hogy az IFN-alfa+gamma keverékek nem haladják meg az ugyanolyan antivirális aktivitással rendelkező IFN-alfa termelésfokozó hatását.

ÖSSZEFOGLALÁS

A humán IFN-gamma termelésével kapcsolatos eredményeink a következők:

1. Az alkalmazott inducerek közül a TPA és az A23187 ionophore megfelelő koncentrációban, a Con A TPA előkezeléssel jó inducere az IFN-gamma termelésnek.

2. Megállapítottuk, hogy IFN-alfa/béta előkezeléssel ("priming") fokozható a Con A indukálta IFN-gamma termelése, és ennek az IFN-nak a fizikokémiai tulajdonságai megegyeznek az IFN-gammára jellemzőkkel.

3. Meghatároztuk, hogy melyek a "buffy coat"-ból származó leukocyták IFN-alfa előkezelést követő, Con A indukálta IFN-gamma termelésének optimális körülményei kis és nagy térfogatban.

4/a. Leírtuk, hogy az előzőleg Sendai vírus hatására IFN-alfát termelt leukocyta szuszpenzióban Con A-val IFN-gamma indukálható nagy térfogatban is.

/b. Kialakítottunk egy kalibrációs görbét, amellyel az IFN-alfát tartalmazó IFN-gamma preparátum IFN-gamma tartalma meghatározható.

5/a. A részlegesen tisztított, 1×10^6 E/mg protein specifikus aktivitású IFN-gamma előállítására kétlépéses kromatográfiás eljárást dolgoztunk ki.

/b. Megállapítottuk, hogy gélszűréssel (Ultrogel AcA 54) az IFN-gamma és IFN-alfa elválasztható egymástól.

6. Jellemeztük az IFN-gamma anticelluláris aktivitását, amely felülmúlja az ugyanolyan antivirális titerű IFN-alfa/bétaét.

7. Megállapítottuk, hogy a spontán cytotoxicitás fokozható az effektor sejtek IFN-alfa és IFN-gamma előkezelésével, ezen a téren a nyers IFN-gamma hatásosabb, mint az IFN-alfa, de a tisztított IFN-gamma nem.

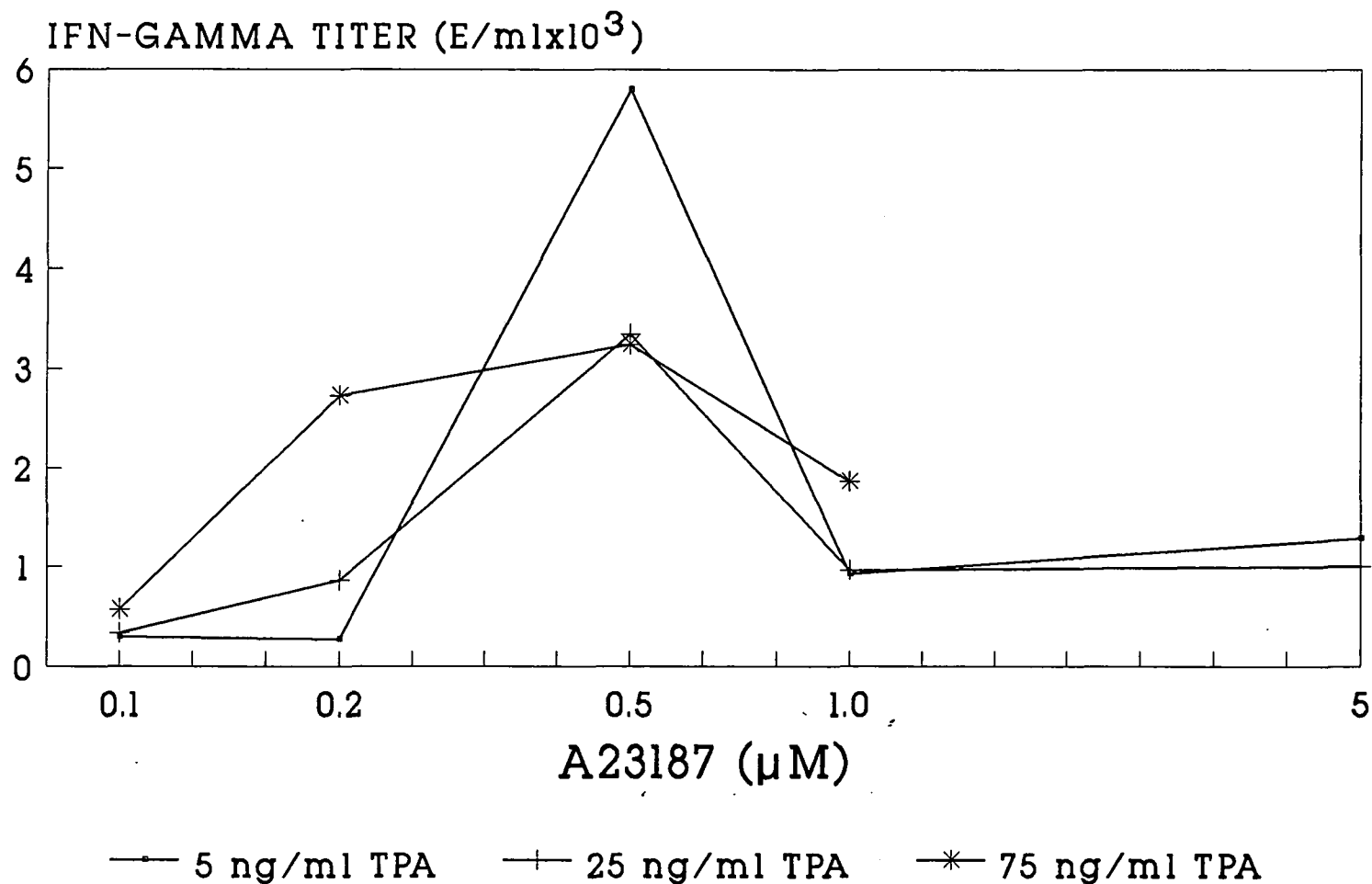
8. Leírtuk, hogy az IFN termelés IFN-gamma előkezeléssel kevésbé hatásosan fokozható, mint az I típusú interferonokkal, és az IFN-gamma nem fokozza az IFN-alfa "priming" aktivitását, e téren nem érvényesül szinergizmus.

Az IFN-alfát is tartalmazó tisztított IFN-gamma preparátumunk hatásos terápiás szer lehet a kétféle IFN között a legtöbb biológiai hatás terén fennálló szinergista együttthatás megléte miatt. A készítmény IFN-alfa és IFN-gamma tartalmának pontos meghatározása, és összetételének standardizálása után lehetségessé válhat klinikai alkalmazása.

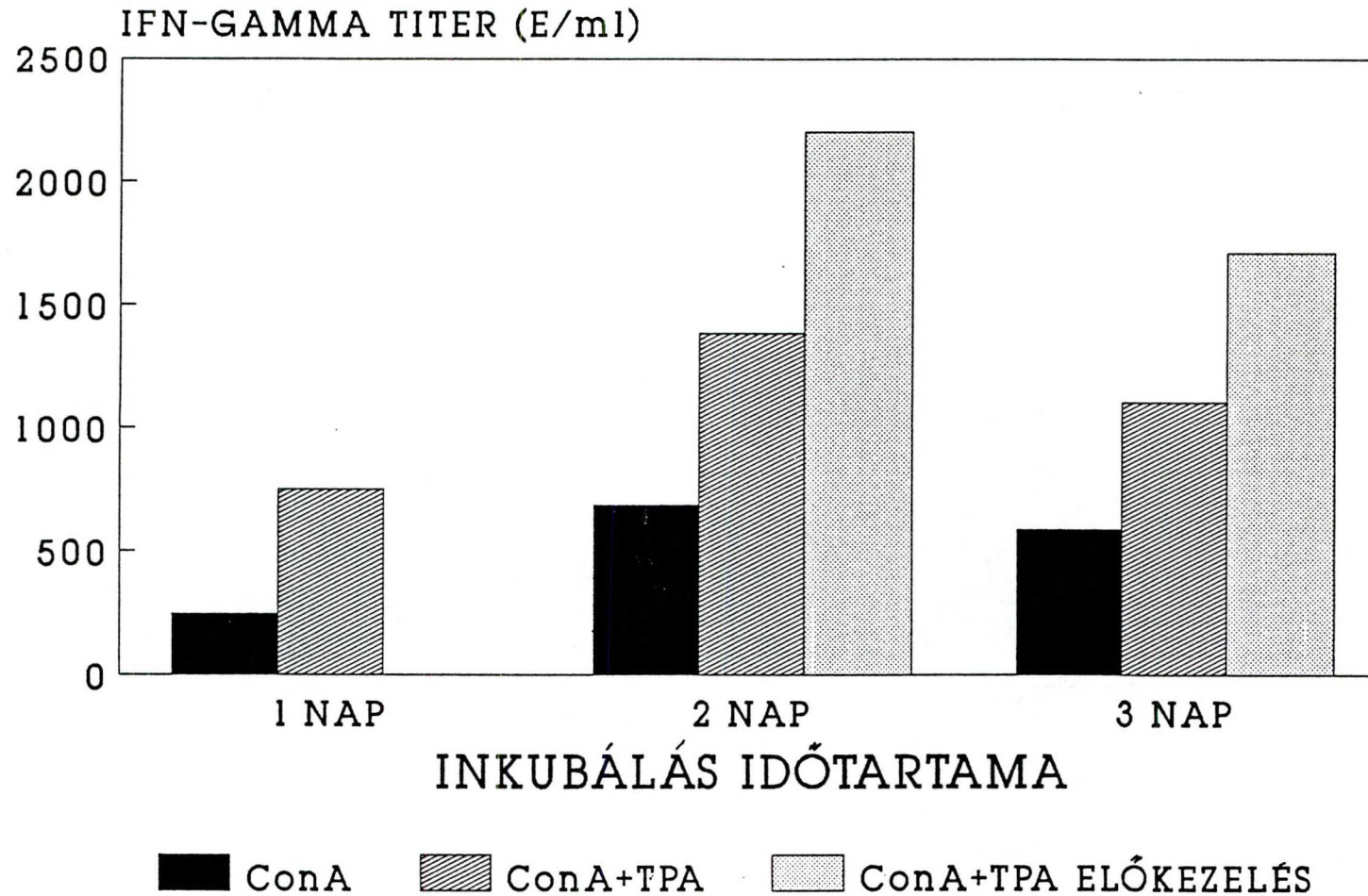


1. ábra

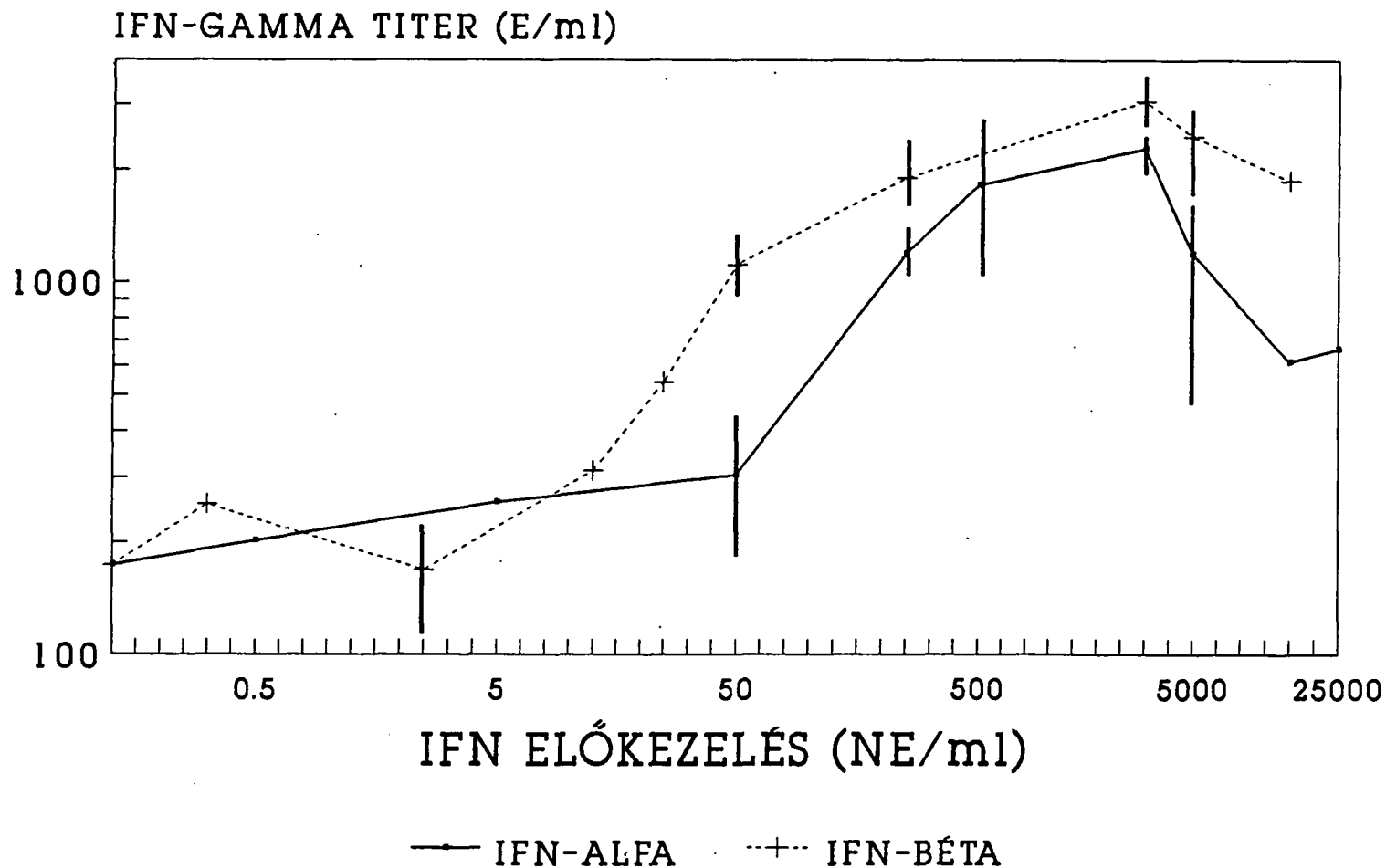
AZ IFN-GAMMA TERMELÉS TPA ÉS A23187 IONOPHORE INDUCEREK HATÁSÁRA



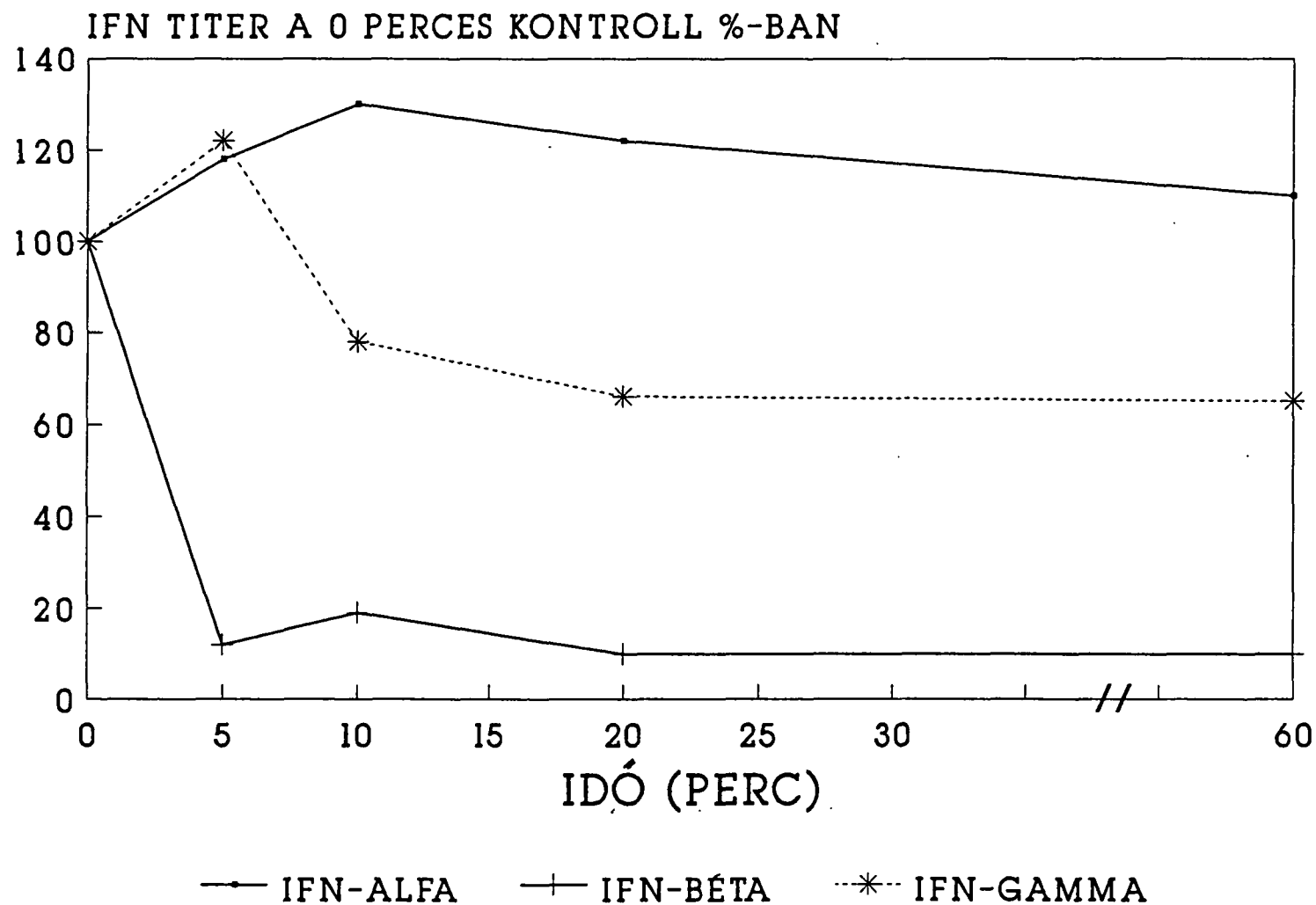
TPA HATÁSA A ConA INDUKÁLTA IFN-GAMMA TERMELÉSRE



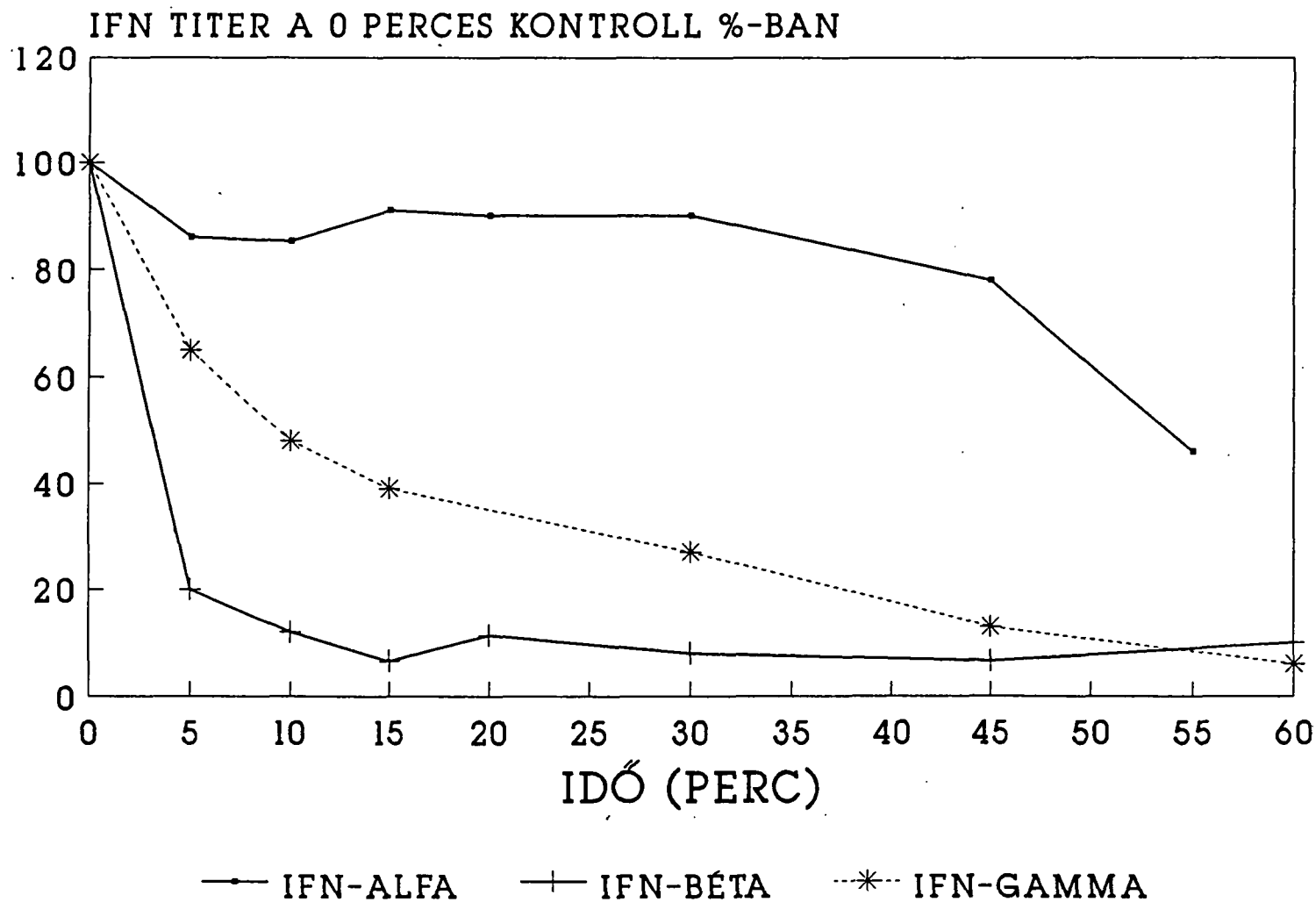
A "PRIMING" HATÁSA A ConA INDUKÁLTA IFN-GAMMA TERMELÉSRE



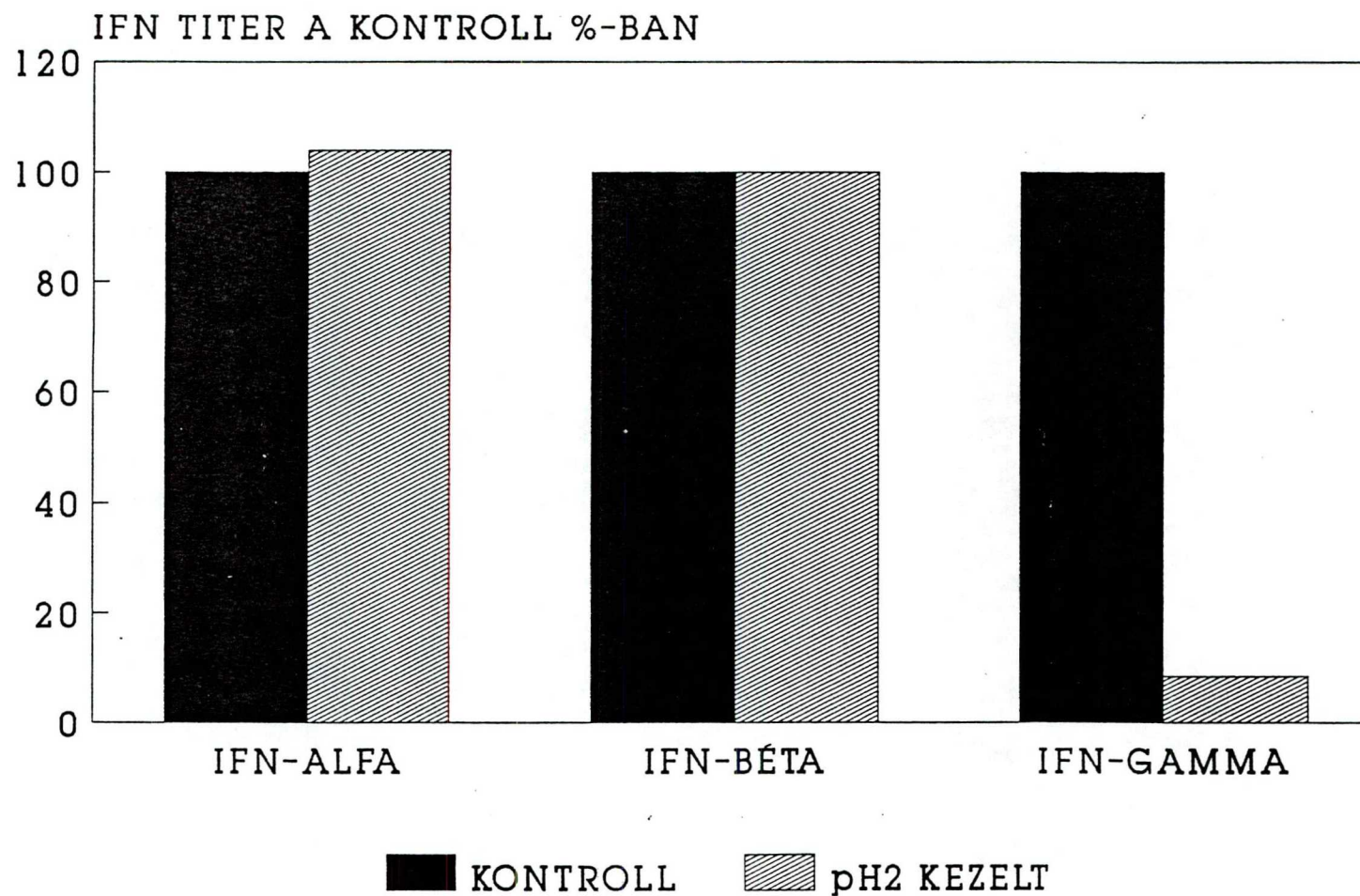
IFN-OK HŐINAKTIVÁLÓDÁSA 37°C-ON



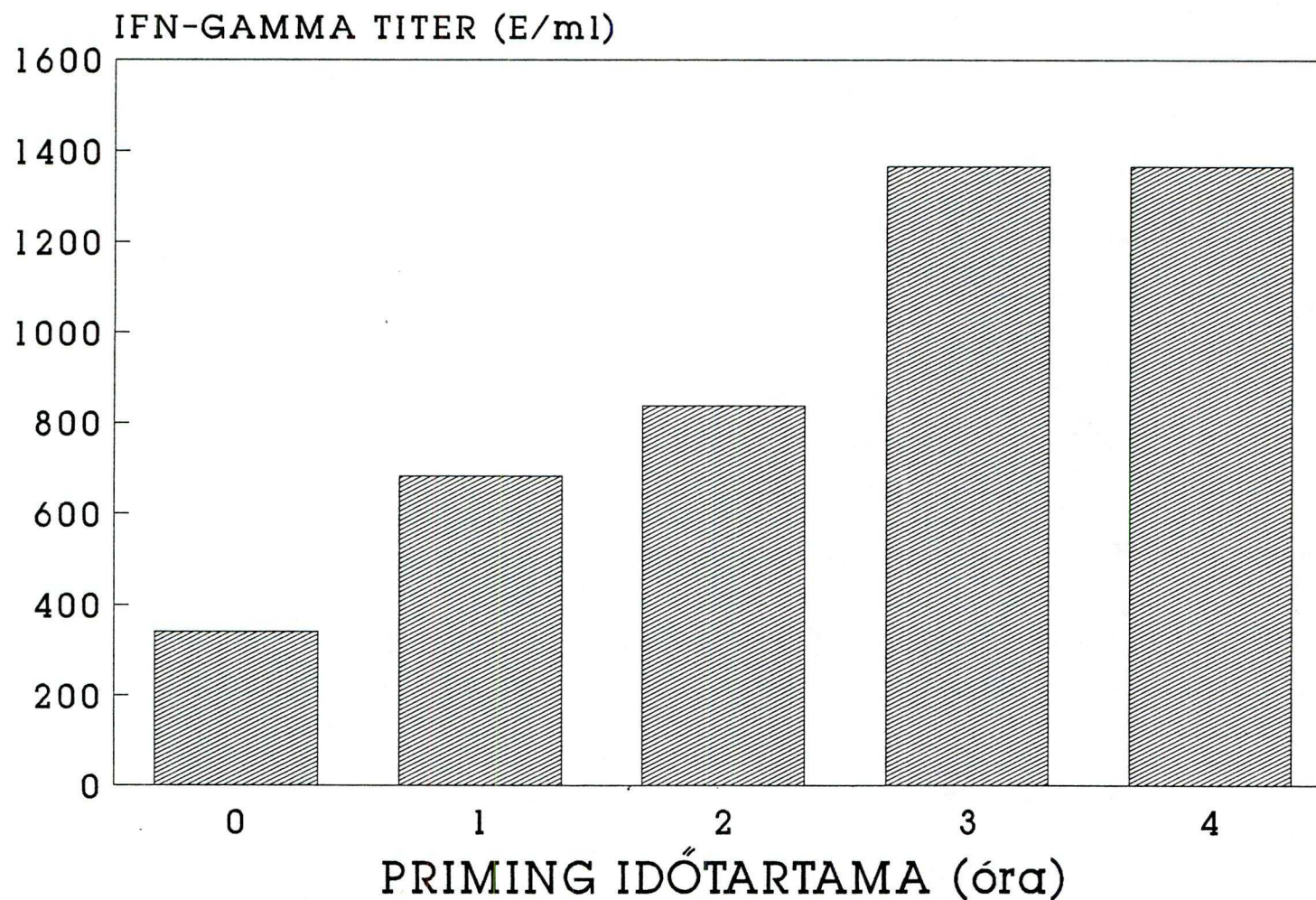
IFN-OK HŐINAKTIVÁLÓDÁSA 56°C-ON



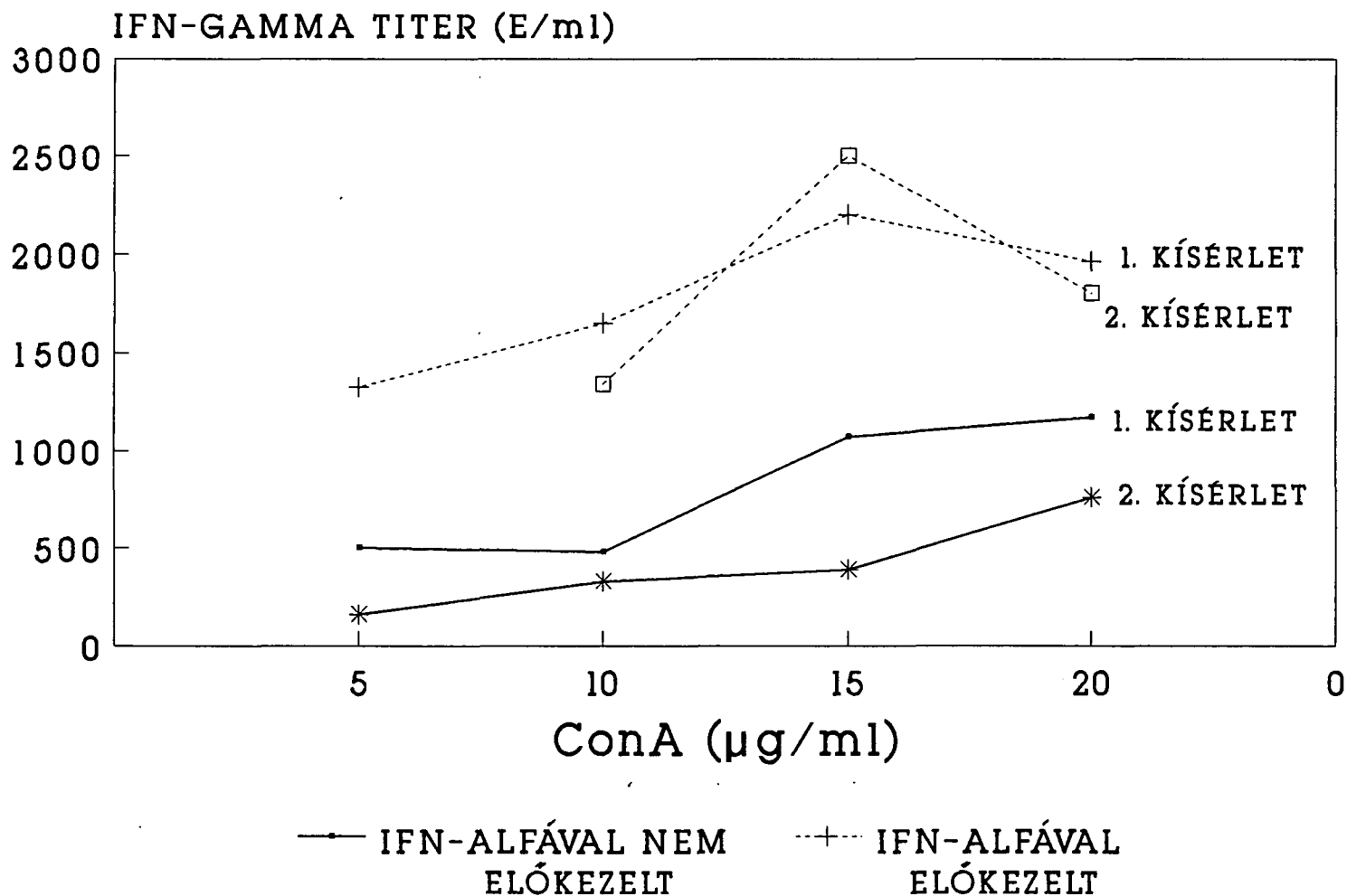
pH2 KEZELÉS HATÁSA AZ IFN-OK ANTIVIRÁLIS AKTIVITÁSÁRA



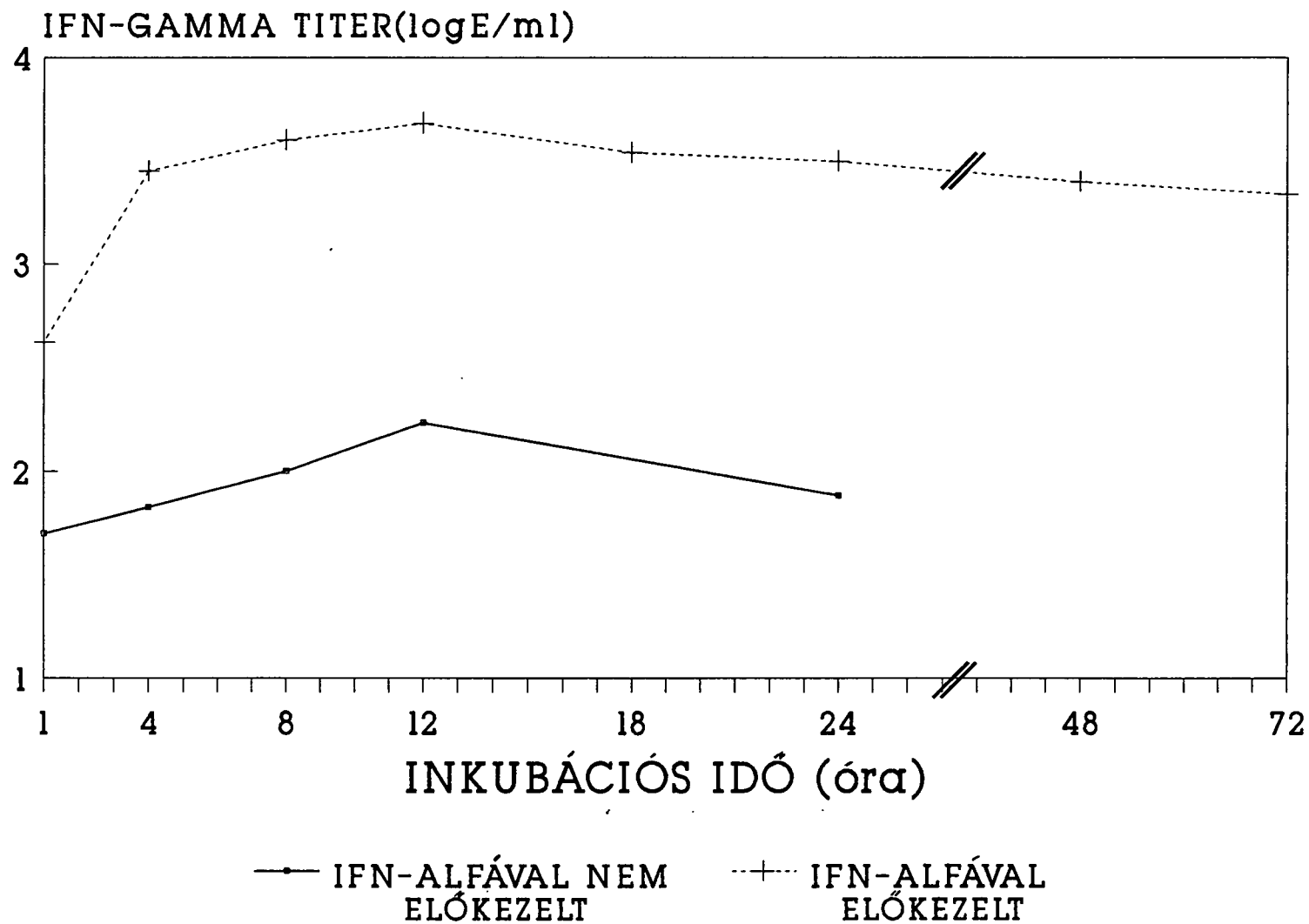
AZ IFN-ALFA KEZELÉS IDŐTARTAMÁNAK HATÁSA AZ IFN-GAMMA TERMELÉSRE



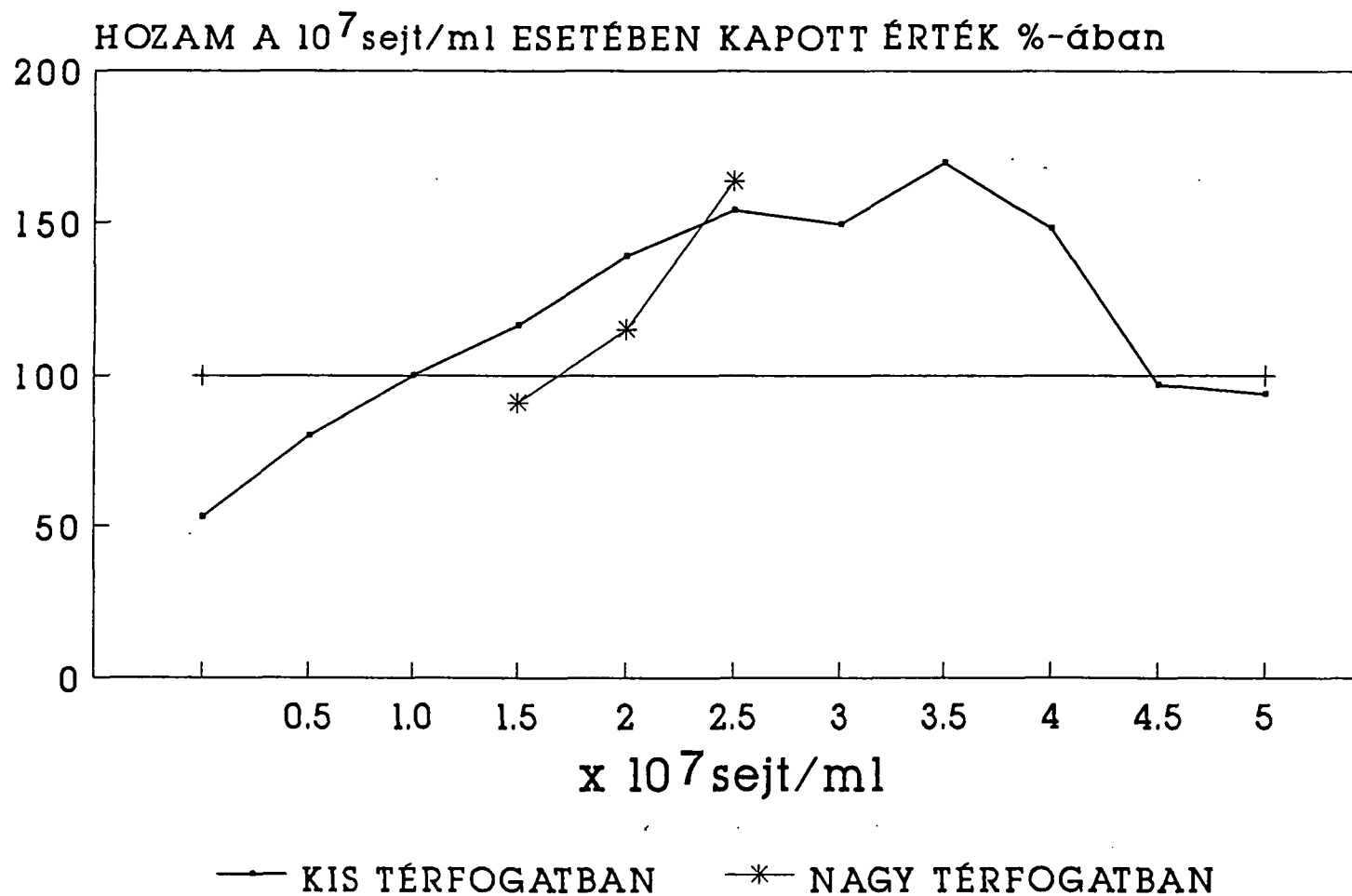
A ConA KONCENTRÁCIÓ HATÁSA AZ IFN-GAMMA TERMELÉSRE



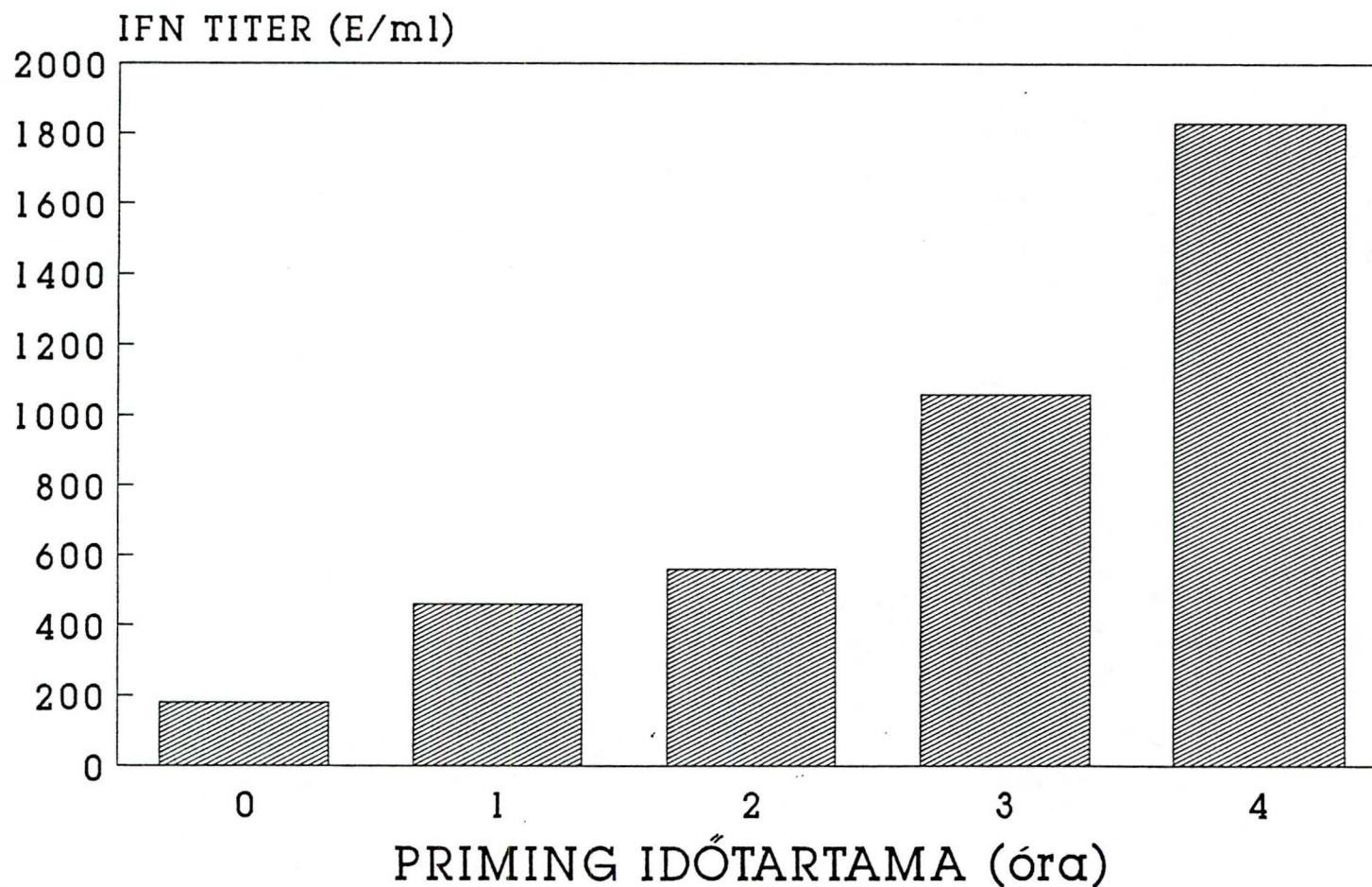
AZ IFN-GAMMA TERMELEÉS KINETIKÁJA



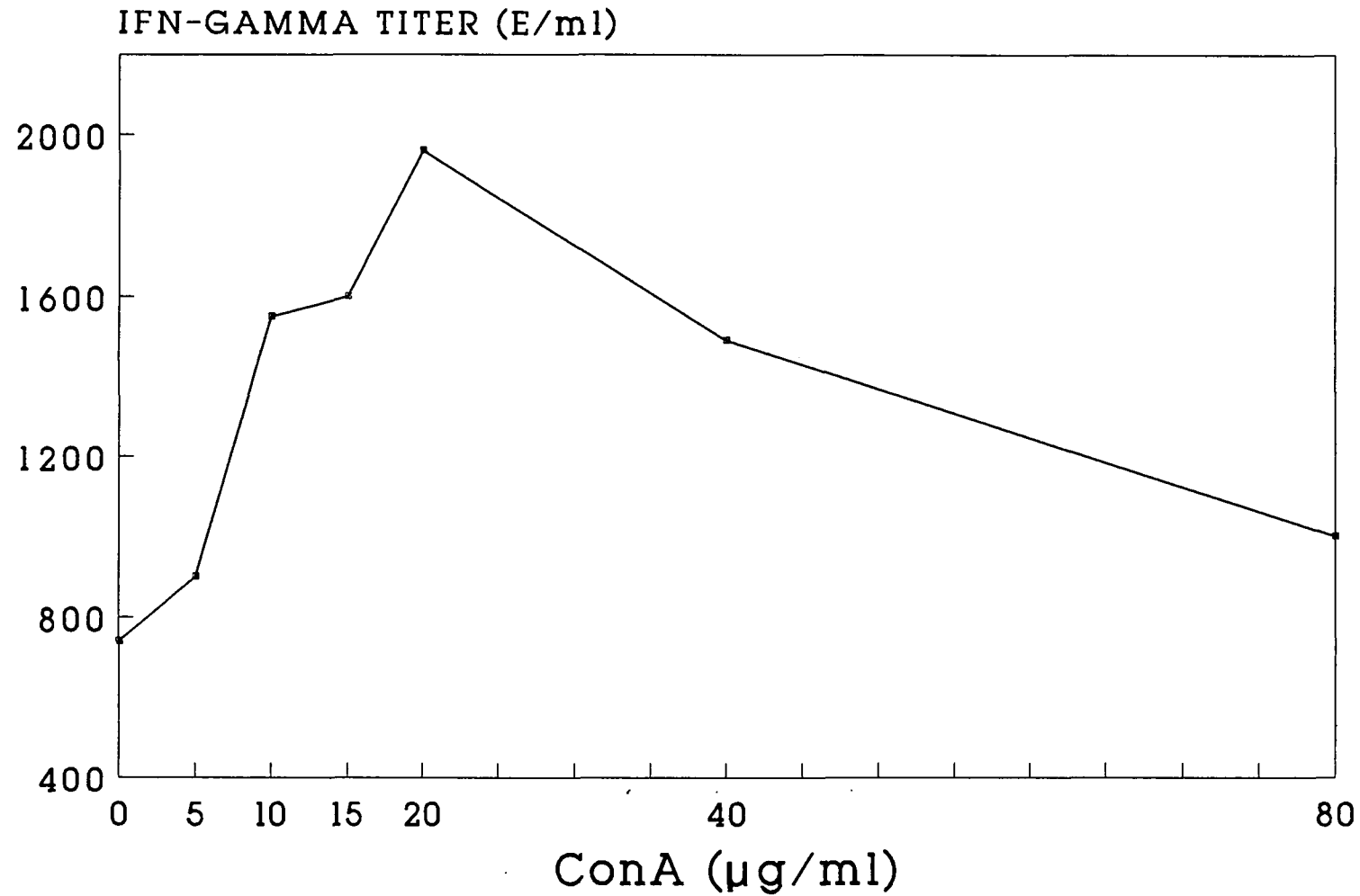
AZ IFN-GAMMA TERMELŐDÉSE A SEJTSZÁM FÜGGVÉNYÉBEN



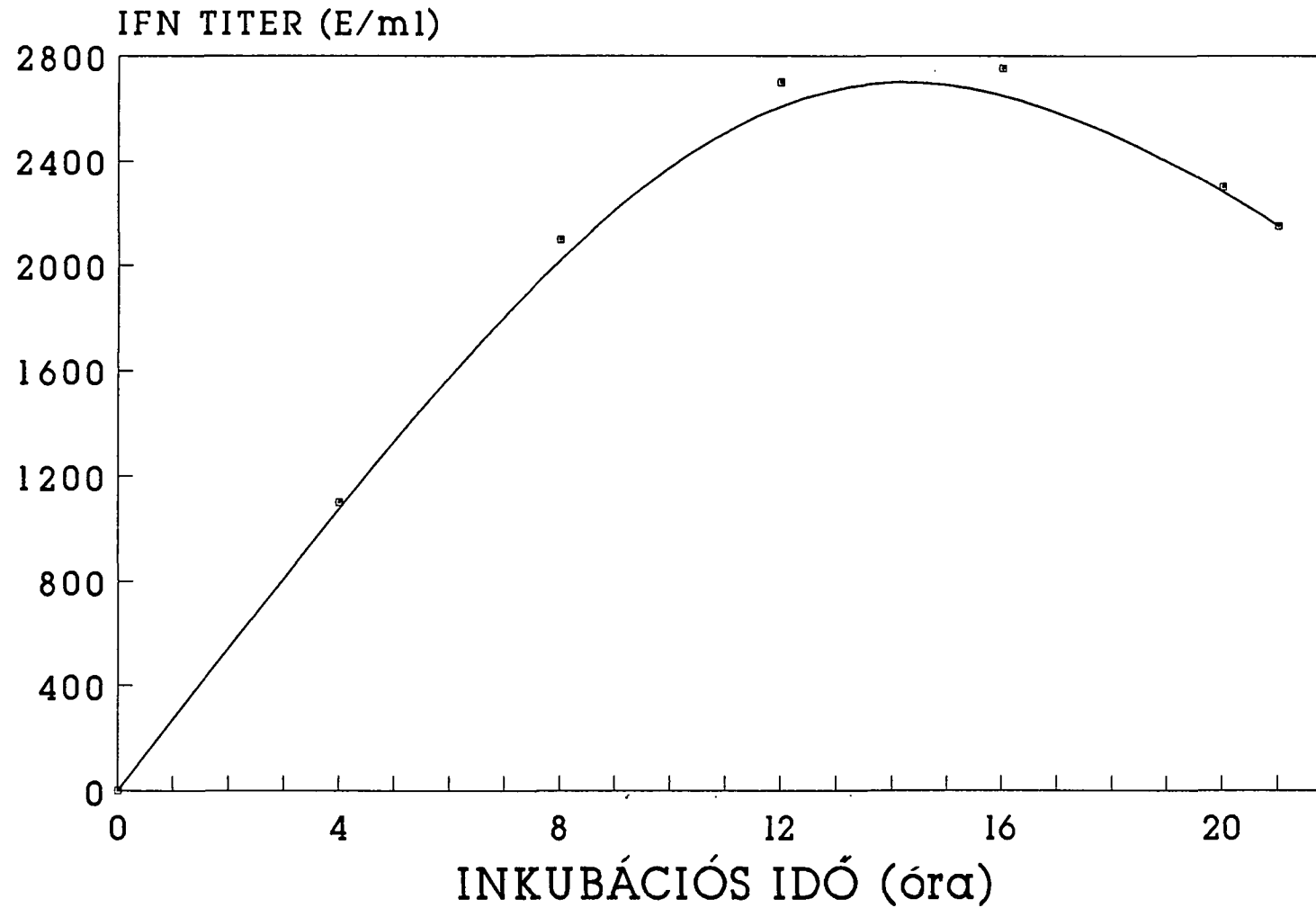
A PRIMING IDŐTARTAMÁNAK HATÁSA AZ IFN-GAMMA TERMELÉSRE ($2,5 \times 10^7$ sejt/ml; NAGY TÉRFOGAT)



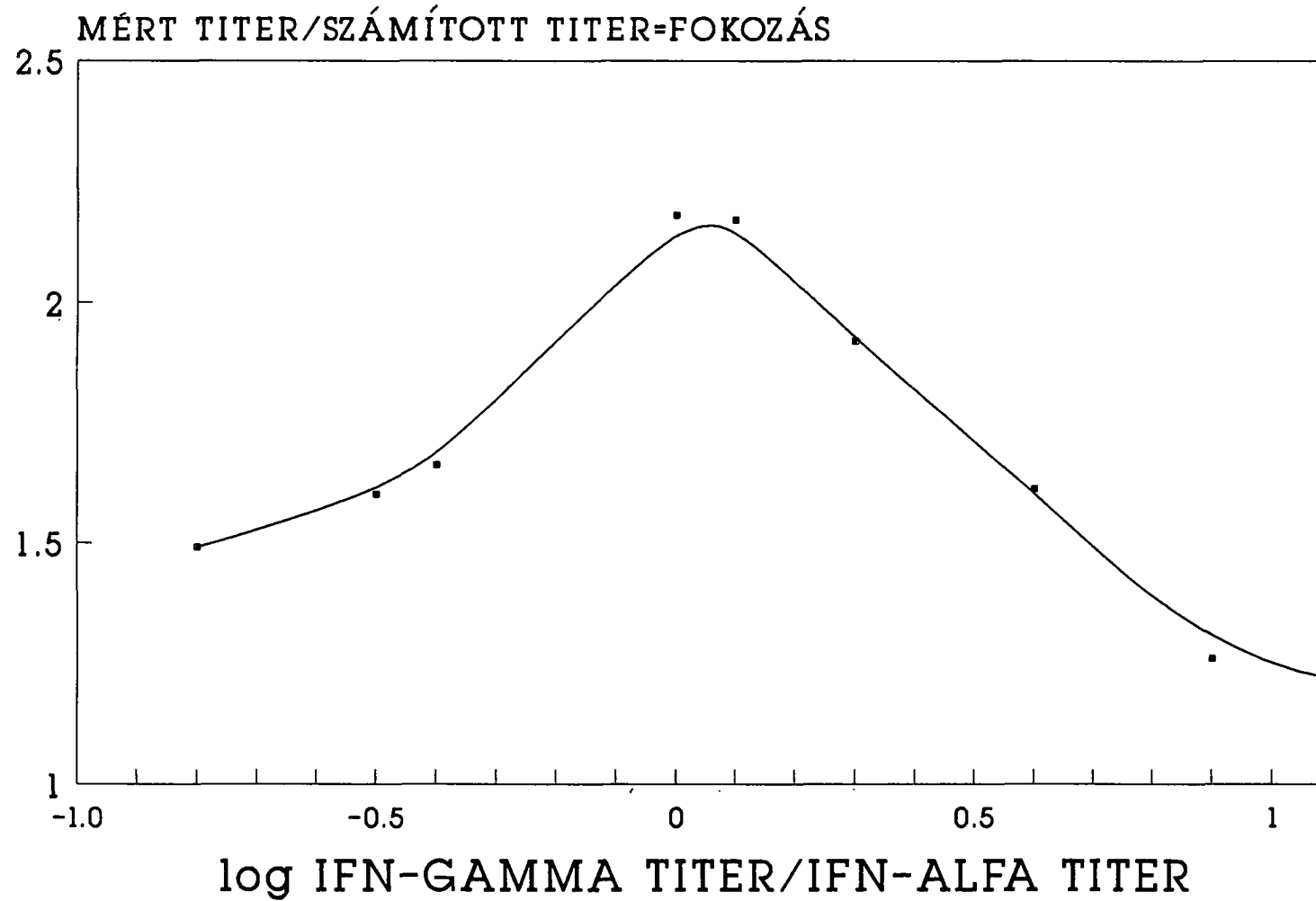
A ConA KONCENTRÁCIÓ HATÁSA AZ IFN-GAMMA TERMELÉSRE ($2,5 \times 10^7$ sejt/ml)



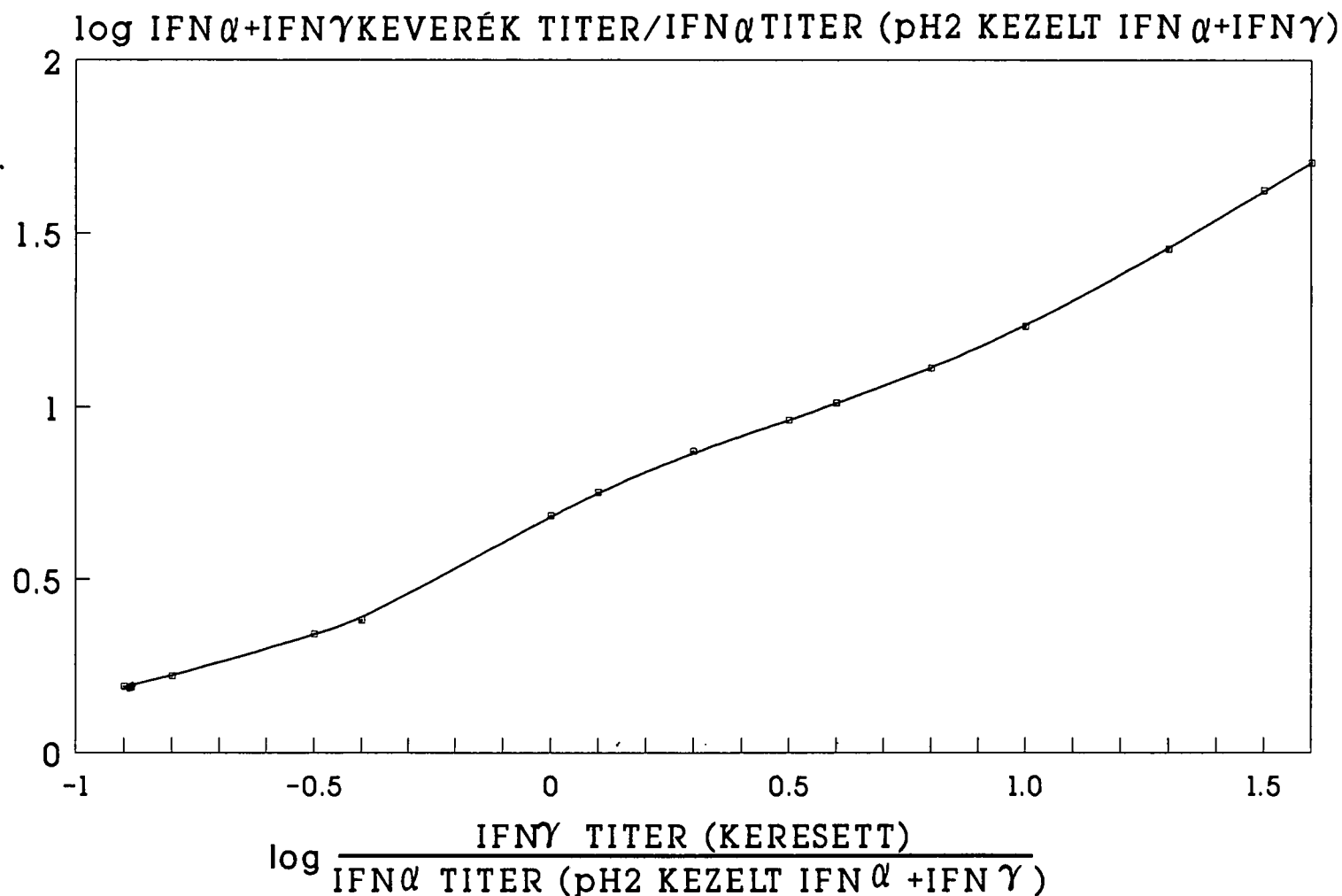
AZ IFN-GAMMA TERMELOŐDÉS KINETIKÁJA NAGY TÉRFOGATBAN



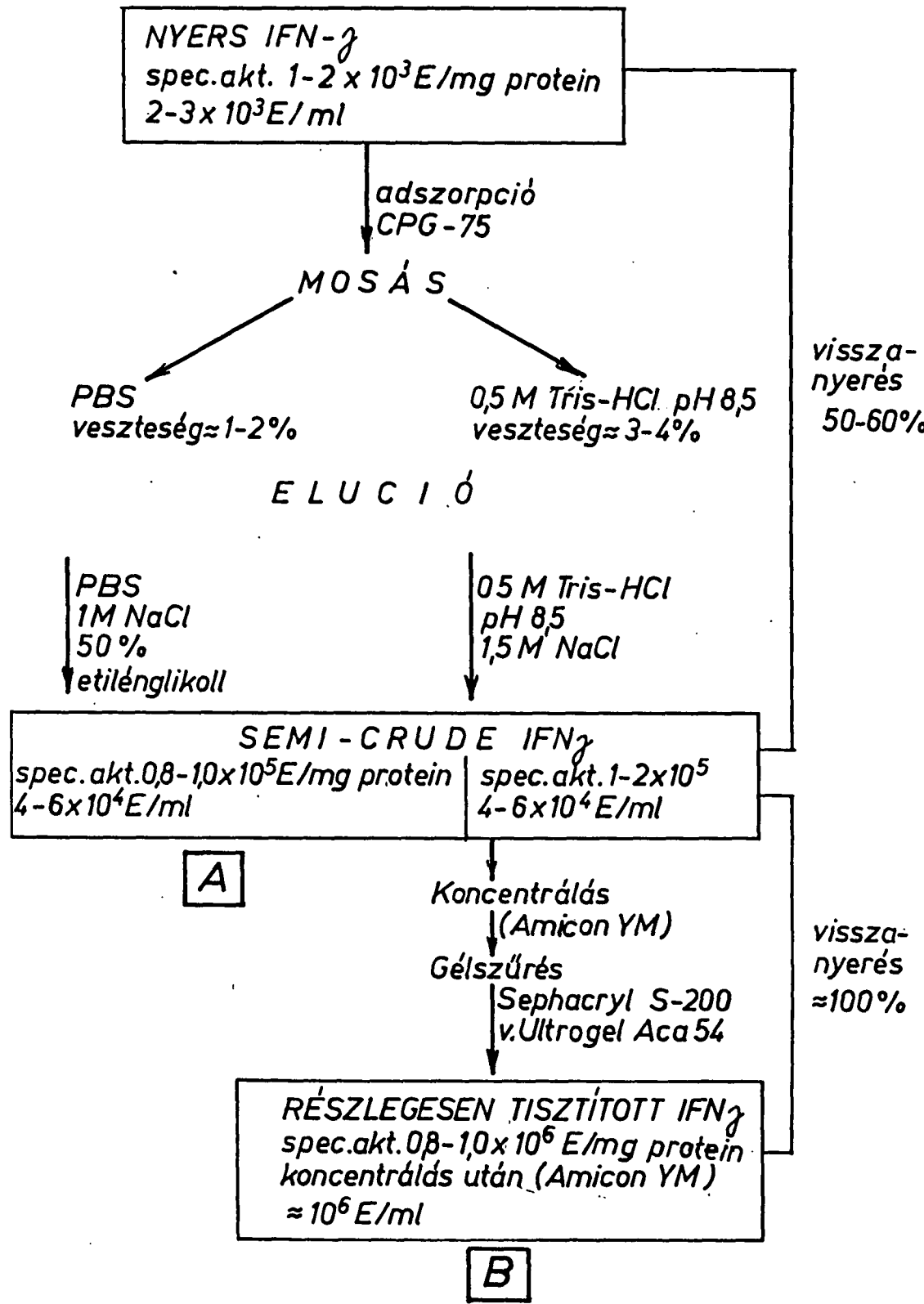
IFN-ALFA + IFN-GAMMA KEVERÉK FOKOZOTT ANTIVIRÁLIS AKTIVITÁSA



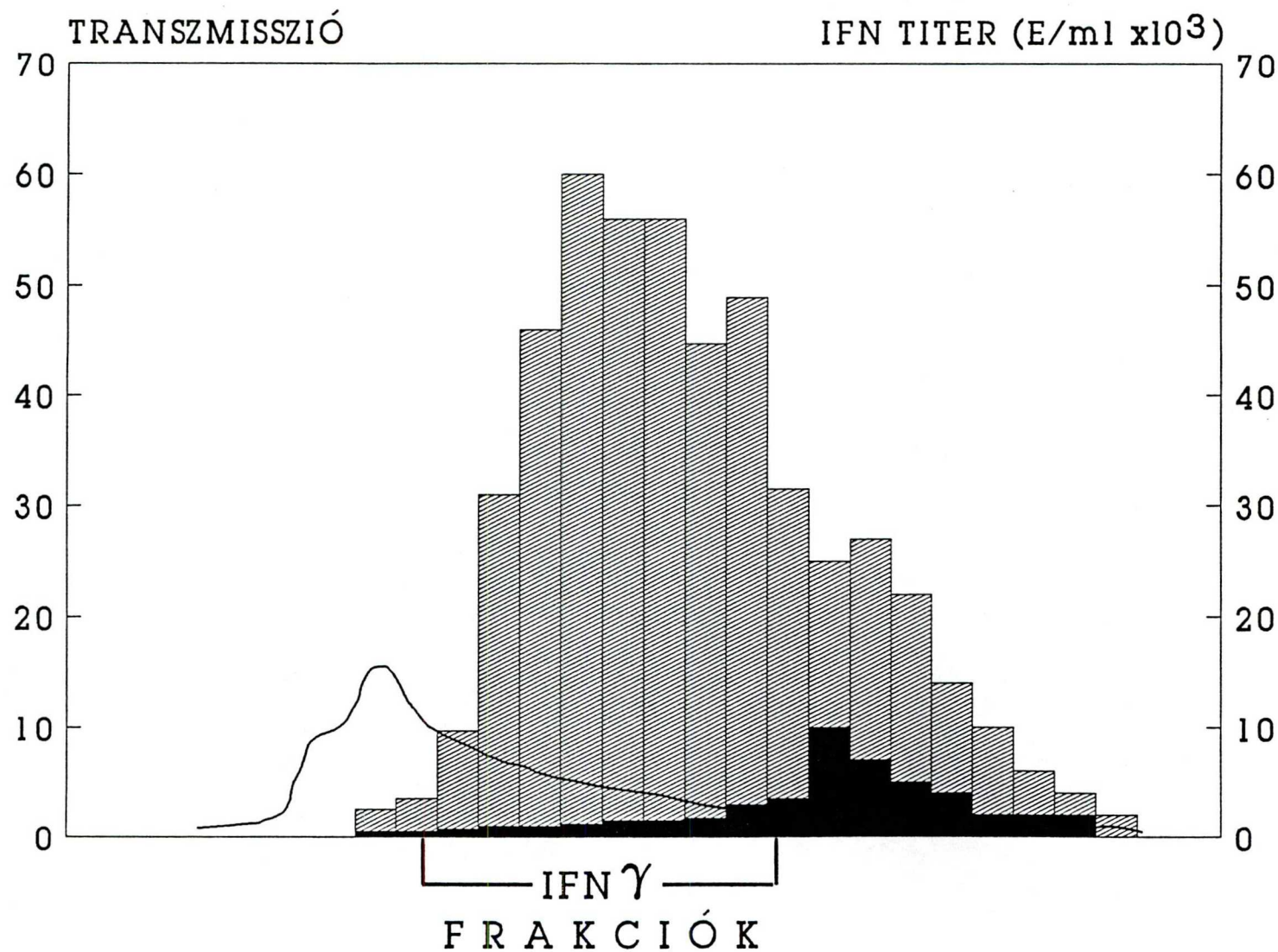
KALIBRÁCIÓS GÖRBE AZ IFN-ALFÁT
TARTALMAZÓ IFN-GAMMA PREPARÁTUM
IFN-GAMMA TITERÉNEK MEGHATÁROZÁSÁHOZ



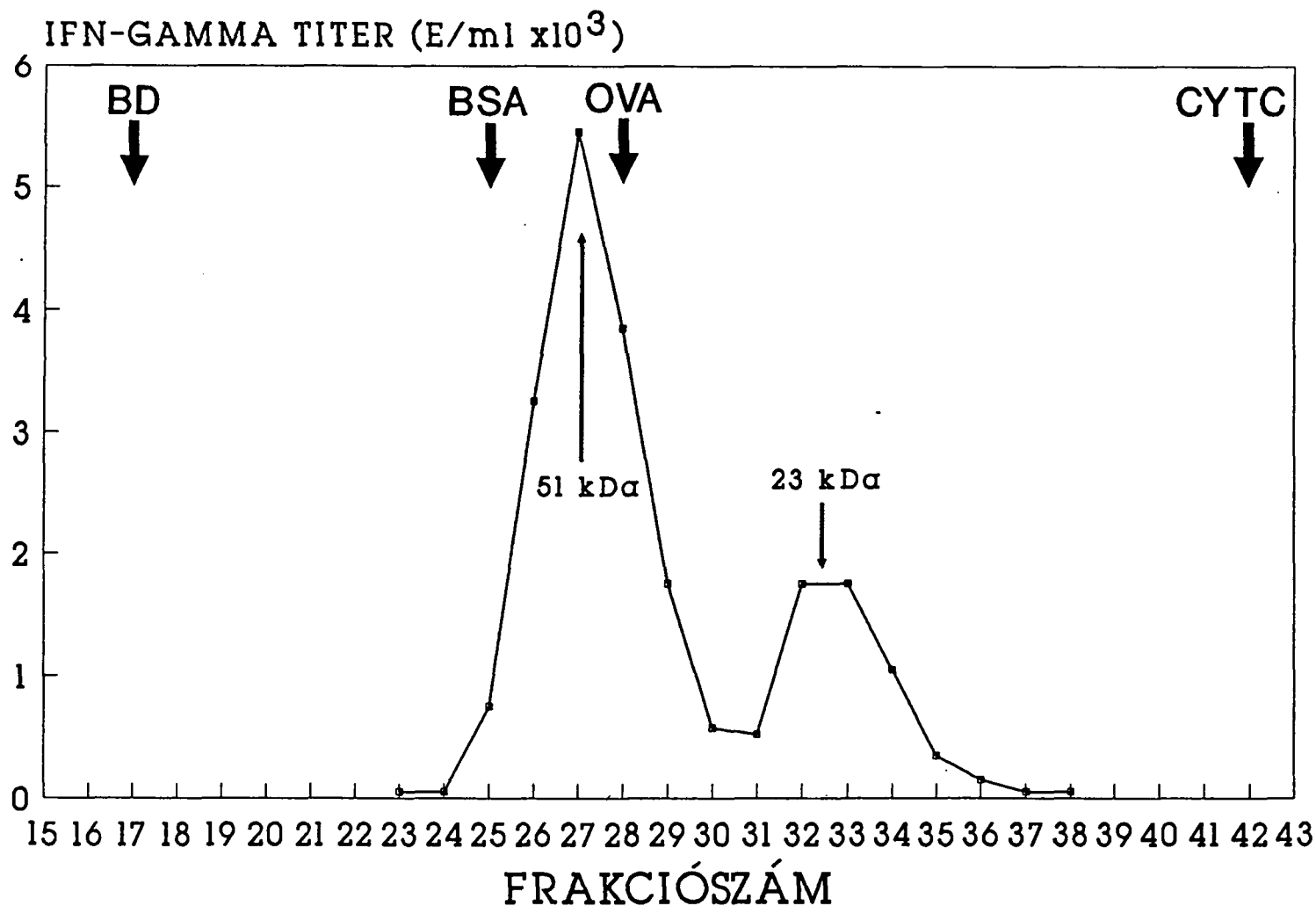
16. ábra



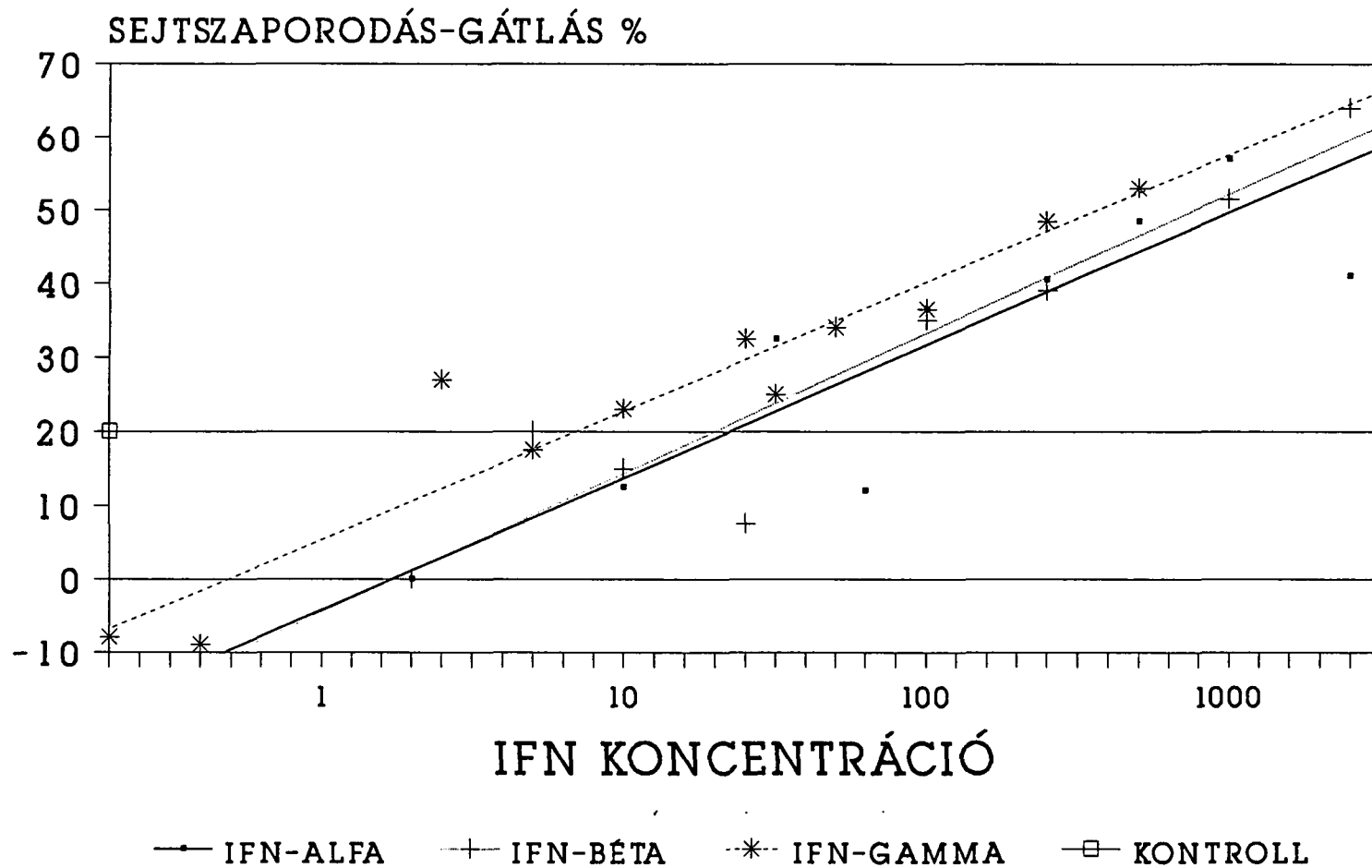
IFN-GAMMA TISZTÍTÁSA ULTROGEL AcA 54 KROMATOGRÁFIÁVAL



IFN-GAMMA MOLEKULASÚLYÁNAK MEGHATÁROZÁSA SEPHACRYL S-200 KROMATOGRÁFIAVAL

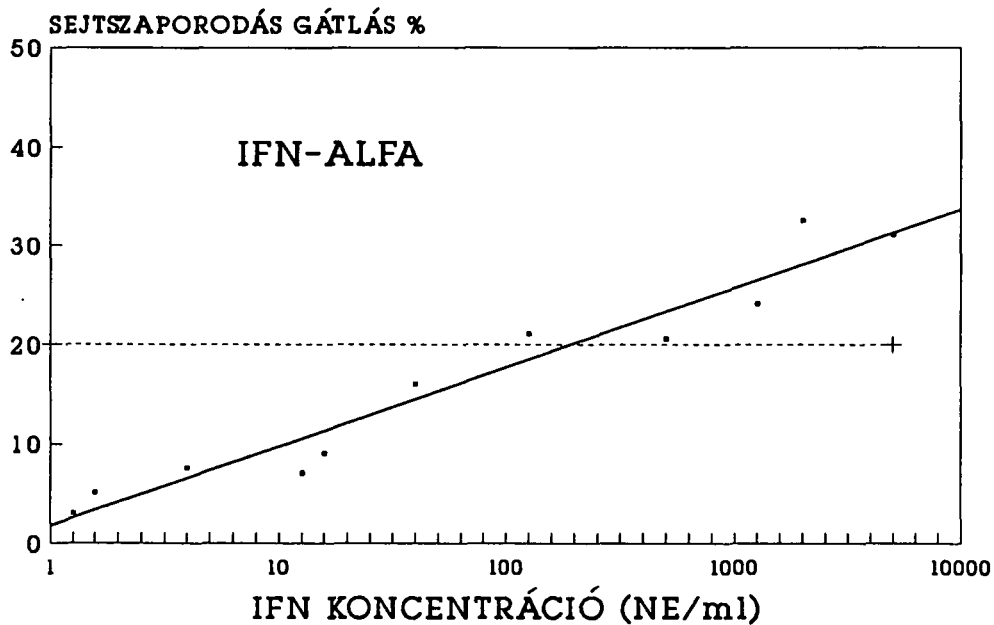


AZ IFN-OK ANTICELLULÁRIS AKTIVITÁSA HEP-2 SEJTEKEN

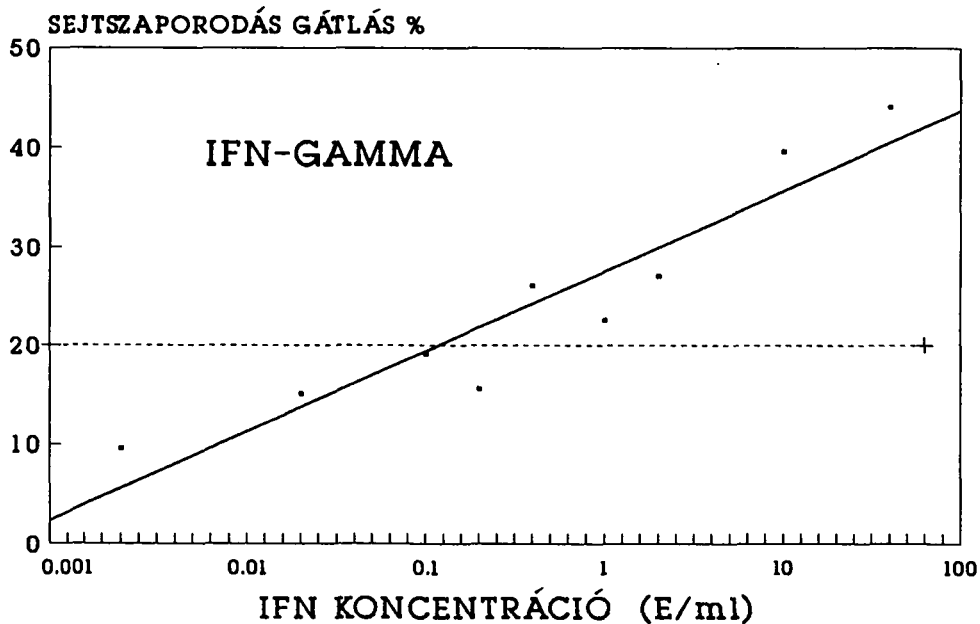


20/a ábra

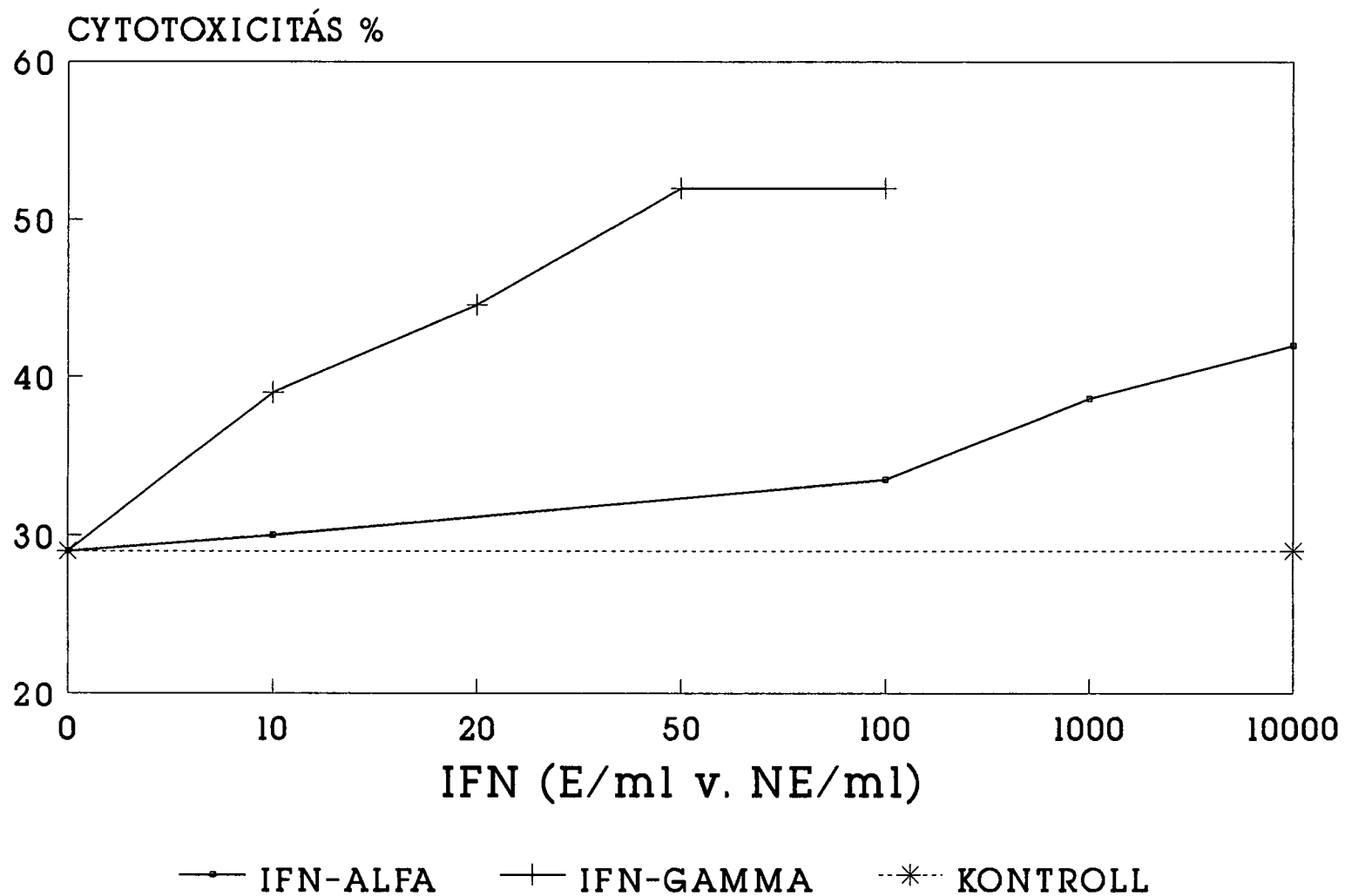
AZ IFN-OK ANTICELLULÁRIS HATÁSA K562 SEJTEKEN



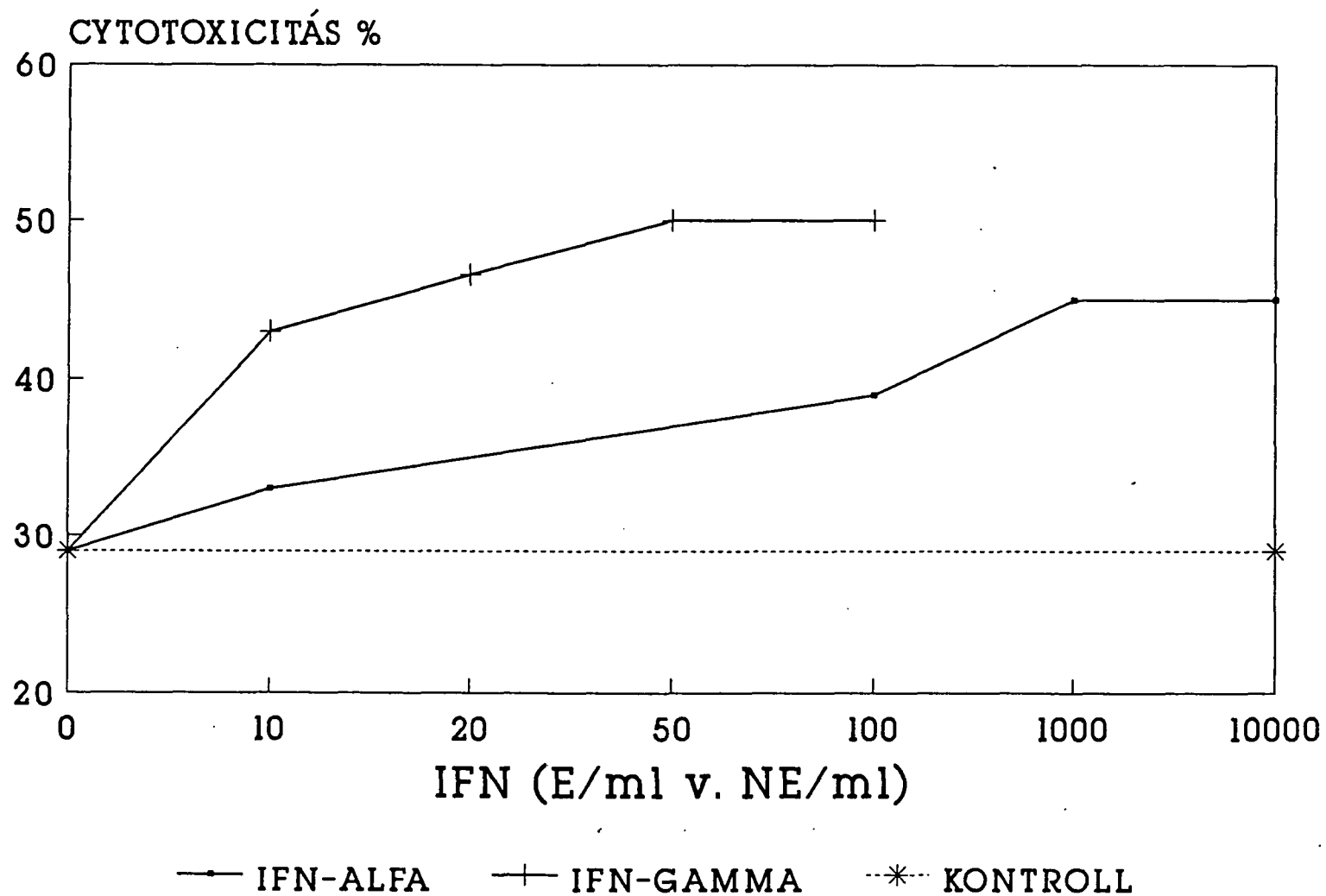
20/b ábra



IFN-OK HATÁSA AZ NK AKTIVITÁSRA

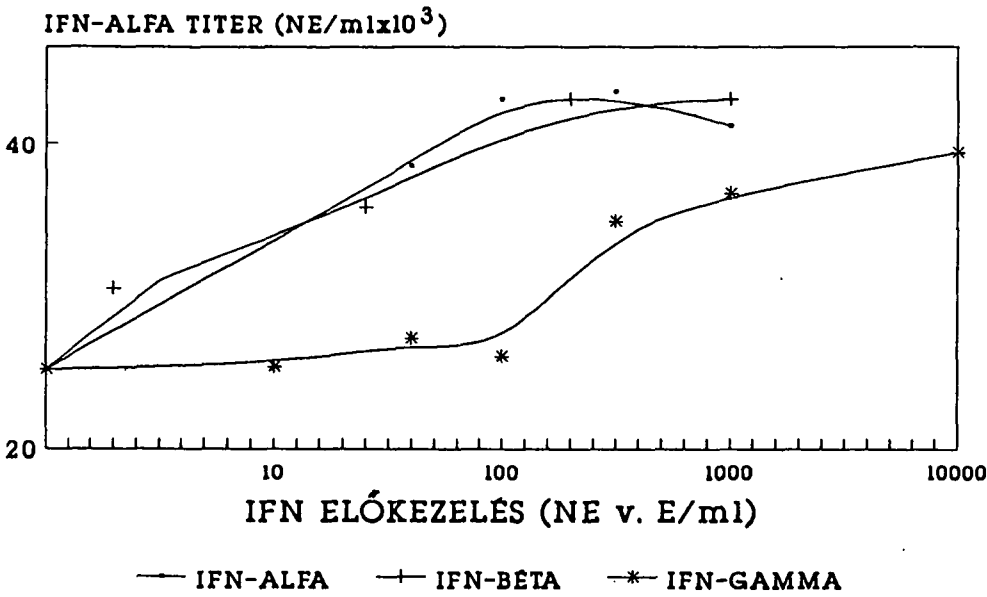


IFN-OK HATÁSA AZ ADCC AKTIVITÁSRA



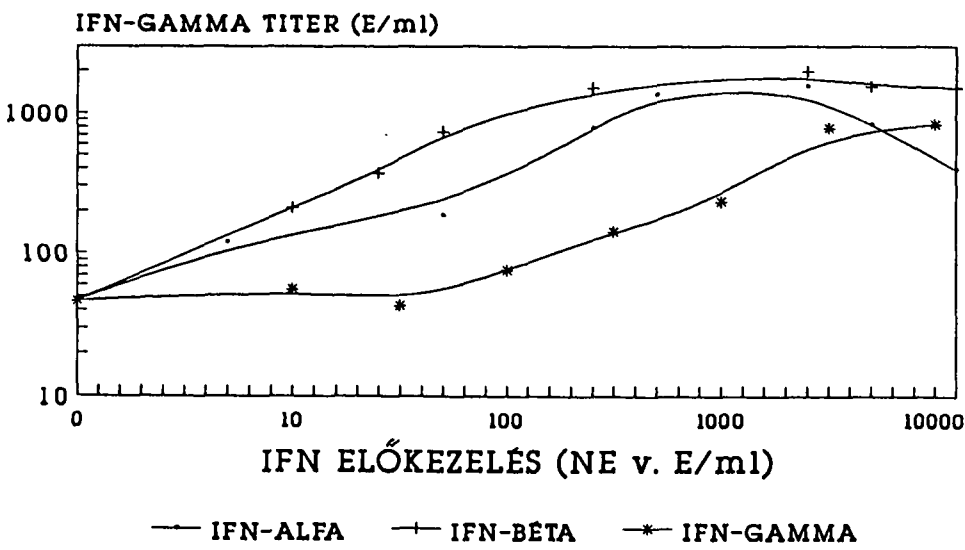
23/a ábra

AZ IFN-ALFA, IFN-BÉTA ÉS IFN-GAMMA
ELŐKEZELÉS HATÁSA AZ IFN-ALFA TERMELÉSRE



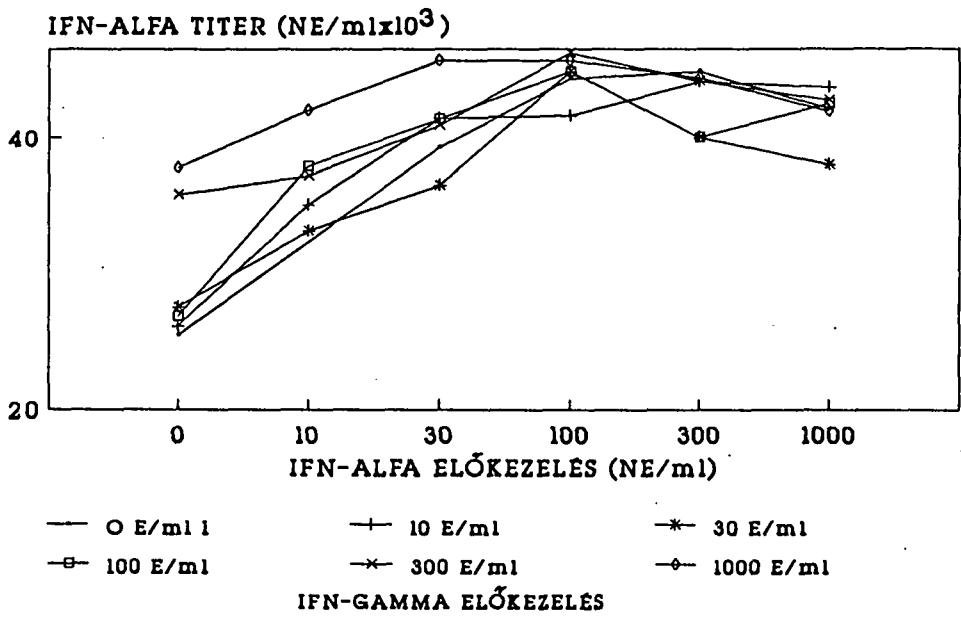
23/b ábra

AZ IFN-ALFA, IFN-BÉTA ÉS IFN-GAMMA
ELŐKEZELÉS HATÁSA AZ IFN-GAMMA
TERMELÉSRE



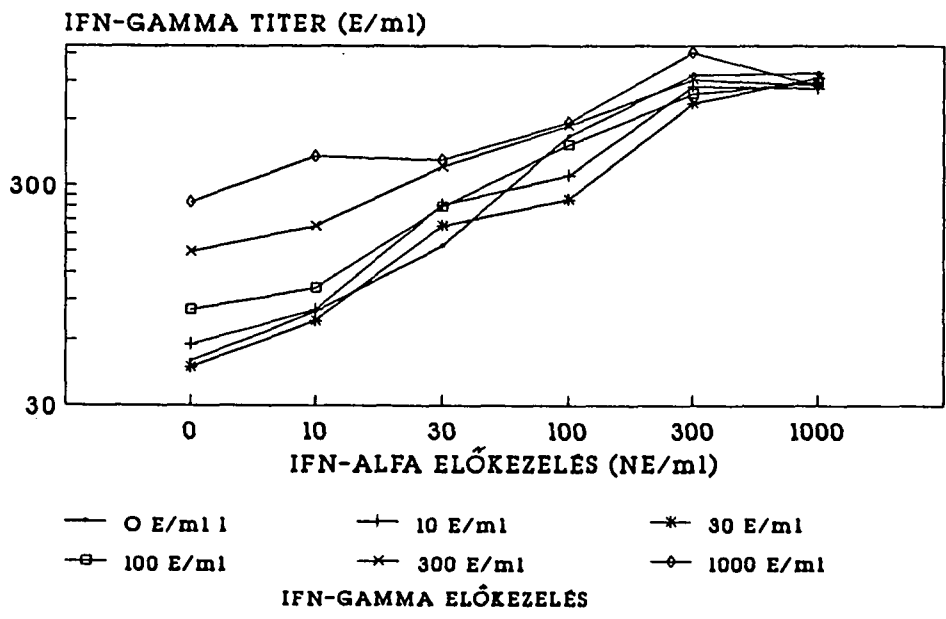
24/a ábra

KEVERT IFN PREPARÁTUMOK HATÁSA AZ
IFN-ALFA TERMEELÉSRE



24/b ábra

KEVERT IFN PREPARÁTUMOK HATÁSA AZ
IFN-GAMMA TERMEELÉSRE



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Béládi Ilona tanszékvezető egyetemi tanárnak, amiért e téma iránti érdeklődésemet támogatta. Irányításával, hasznos tanácsaival segítette munkámat, és lehetővé tette a doktori értekezésem elkészítését.

Munkámhoz nélkülözhetetlen segítséget nyújtott irányadó tanácsaival, a különböző laboratóriumi módszerek megismertetésével Dr. Tóth Miklós.

Köszönetet mondok a kísérletek elvégzése során nyújtott segítségért Dr. Tóth Sándornak és Zsedényi Sárának.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Mándi Yvette-nek, Dr. Mécs Imrének, Dr. Pusztai Rozáliának, Dr. Rosztóczy Istvánnak és Dr. Taródi Bélának, hogy hozzájárultak a szakmai fejlődésemhez.

Lelkiismeretes és nélkülözhetetlen asszisztensi segítségéért elsősorban Horváth Katalinnak vagyok hálás. Ambrus Erzsébet és Naszradi Miklósné munkáját is köszönöm.

Hálás vagyok Dr. Rosztóczy Istvánnénak a gépeléssel kapcsolatos gondos és figyelmes segítségéért.

A TÉMAKÖRREL KAPCSOLATOS SAJÁT KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK, SZABADALMAK

Közlemények

- 1./ Tóth M., Mécs I., Tóth S., Endrész V., Béládi I.:
Semi-crude human leukocyte interferon production in a simple medium.
Acta Microbiol. Hung. **31**, 61-67 (1984)
- 2./ Mándi Y., Tóth S., Endrész V., Tóth M., Béládi I.:
A humán leukocytá és immun-interferon sejtosztódást gátló és immunmoduláns hatása.
Kísérlet. Orvostud. **36**, 326-330 (1984)
- 3./ Béládi I., Tóth M., Endrész V., Tóth S.:
Human interferons alpha and beta have more potent priming activities than interferon gamma. (Abstract)
Antiviral Res. ABSTR. **1/3**, 132 (1984)
- 4./ Endrész V., Tóth M., Tóth S., Mándi Y., Béládi I.:
Priming activity of human interferon types in comparison with their other biological effects. (Abstract)
Acta Microbiol. Hung. **31**, 261 (1984)
- 5./ Tóth M., Endrész V., Tóth S., Béládi I.:
Human interferons alpha and beta have more potent priming activities than interferon gamma.
J. gen. Virol. **66**, 893-896 (1985)
- 6./ Endrész V., Tóth S., Tóth M.:
Production of high titre human interferon-gamma in primed leukocyte cultures.
Acta Microbiol. Hung. **32**, 395-398 (1985)

Előadások

- 1./ Tóth S., Endrész V., Mándi Y., Pusztai R., Molnár K., Béládi I.:
Human interferonok nem antivirális hatásainak vizsgálata.
SZAB és SZOTE Tudományos Ülése, Szeged.
1982. X. 26.
- 2./ Béládi I., Tóth M., Mécs I., Tóth S., Endrész V., Pusztai R.:
Large scale production of human IFN- α by leukocytes.
7th Regional Symposium of the Socialist Countries on
Interferon, Varna, Bulgaria.
1982. XI. 10.
- 3./ Tóth S., Mándi Y., Endrész V., Rosztóczy I., Pusztai R.,
Béládi I.:
Comparison of some biological activities of different human
interferons.
7th Regional Symposium of the Socialist Countries on
Interferon, Varna, Bulgaria.
1982. XI. 10.
- 4./ Rosztóczy I., Siroki O., Endrész V., Béládi I.:
Effect of interferon and interferon inducers on leukocyte
migration stimulatory activity of sera of mice treated with
mitogens.
Joint Congress of the ETCS and EURES, Budapest.
1983. V. 13.
- 5./ Endrész V., Tóth M., Tóth S., Mándi Y., Béládi I.:
Humán interferonok priming aktivitása összehasonlítva egyéb
biológiai hatásaikkal.
Magyar Mikrobiológiai Társaság 9. Kongresszusa, Budapest.
1983. VIII. 24.

- 6./ Tóth M., Endrész V., Tóth S., Béládi I.:
Human interferon alfa and beta have more potent priming activities than interferon gamma.
8th Regional Symposium of the Socialist Countries on Interferon, Dobogókő.
1984. IX. 4.
- 7./ Béládi I., Tóth M., Endrész V., Tóth S.:
Human interferons alpha, and beta have more potent priming activities than interferon gamma.
TNO-ISIR Meeting on the Interferon System, Heidelberg, Germany.
1984. X. 24.
- 8./ Endrész V., Tóth M., Tóth S., Béládi I.:
The priming activities of human interferons alpha, beta and gamma.
"Immunobiologics and their Application", Budapest.
1985. IV. 23.
- 9./ Béládi I., Tóth M., Mécs I., Taródi B., Endrész V., Tóth S.:
Consecutive production of alpha and gamma interferons in human leukocytes.
2nd Cuban Seminar on Interferon, Havana, Cuba
1986. II. 22.
- 10./ Endrész V., Tóth M., Mécs I., Taródi B., Tóth S., Béládi I.:
Consecutive production of IFN- α and IFN- β in human leucocytes.
9th Regional Conference of the Socialist Countries on Interferon, Jena, DDR.
1986. X. 14.

Szabadalmak

- 1./ Béládi Ilona, Tóth Miklós, Rosztóczy István, Tóth Sándor,
Endrész Valéria:
Eljárás humán gamma-interferon előállítására.
Bejelentő: EGYT, (3594/81. sz.)
Budapest, 1981.
- 2./ Tóth Miklós, Endrész Valéria, Béládi Ilona, Tóth Sándor:
Komplex eljárás humán leukocyta és humán gamma interferon
egymást követő előállítására.
Bejelentő: EGYT, (4237/83. sz.)
Budapest, 1983.

IRODALOM

- Aboud, M., Shoor, R., Salzberg, S.:
J. gen. Virol. 51, 425, 1980
- Adolf, G.R.:
J. gen. Virol. 68, 1669, 1987
- Aebi, M., Föh, J., Hurt, N., Samuel, C.E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O., Staeheli, P.:
Mol. Cell. Biol. 9, 5062, 1989
- Aguet, M., Dembic, Z., Merlin, G.:
Cell 55, 273, 1988
- Aguet, M., Gröbke, M., Dreiding, P.:
Virology 132, 211, 1984
- Akerman, K.E.O., Andersson, L.C.:
Eur. J. Immunol. 14, 286, 1984
- Allwood, G.G.L, Asherson, G.L., Davey, M.J., Goodford, P.J.:
Immunology 21, 509, 1971
- Antonelli, G., Ruggiero, V., Cefaro, A., Di Marco, P., Amicucci, P., Colizzi, V., Dianzani F.:
J. Interferon Res. 8, 193, 1988
- Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.R., Fiers, W.:
J. Immunol. 134, 2444, 1985
- Attallah, A.M., Needy, C.F., Noguchi, P.D., Elisberg, B.L.:
Int. J. Cancer 24, 4952, 1979
- Badaro, R., Falcoff, E., Badaro, F.S., Carvalho, E.M.:
N. Engl. J. Med. 322, 16, 1990
- Baron, S., Dianzani, F.:
Tex. Rep. Biol. Med. 35, 1, 1977
- Baron, S., Weigent, D., Stanton, G.J., Peterson, J.:
Antiviral Res. Suppl. 1, 173, 1985
- Basham, T.Y., Bourgeade, M.T., Creasey, A.A., Merigan T.C.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 3265, 1982
- Basham, T.Y., Merigan, T.C.:
J. Immunol. 130, 1492, 1983

- Belkowski, L.S., Sen, G.C.:
J. Virol. 61, 653, 1987
- Berg, K.:
Scand. J. Immunol. 6, 77, 1977
- Béládi, I., Pusztai, R.:
J. Naturforsch. 22b, 165, 1967
- Billiau, A., Dijkmans, R.:
Biochem. Pharm. 40, 1433, 1990
- Billiau, A., Heremans, H., Allen, P.T., De Maeyer-Guignard, J., De
Somer, P.:
Virology 73, 537, 1976
- Billiau, A., Joniau, M., De Somer, P.:
J. gen. Virol. 19, 1, 1973
- Blackmann, M.J., Morris, A.G.:
J. gen. Virol. 65, 955, 1984
- Blanchard, D.K., Djeu, J.Y., Klein, T.W., Friedman, H., Stewart,
II., W.E.:
In: The Biology of the Interferon System, eds. W.E. Stewart,
H. Schellekens, p. 217, 1986
- Bodo, G.:
Method. Enzymol. 78, 69, 1981
- Borden, C.E.:
Clin. Immunol. Immunopathol. 62, 518, 1992
- Böyum, A.:
J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 77, 1968
- Bradford, M.M.:
Analyt. Biochem. 72, 248, 1976
- Branca, A.A., Baglioni, C.:
Nature 294, 768, 1981
- Braude, I.A.:
J. Immunol. Methods 63, 237, 1983
- Bursuker, I., Pearce, H.T.:
J. Interferon Res. 10, 1, 1990
- Byrne, G.L., Lehmann, L.K., Kirschbaum, J.G., Borden, E.C., Lee,
C.M., Brown, R.R.:
J. Interferon Res. 6, 389, 1986

- Candler, R.V., Rouse, B.T., Moore, R.N.:
J. Interferon Res. 5, 179, 1985
- Cantell, K., Hirvonen, S., Koistinen, V.:
Method. Enzymol. 78, 499, 1981
- Capobianchi, M.R., Facchini, J., Di Marco, P., Antonelli, G.,
Dianzani, F.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 178, 551, 1985
- Chadha, K.C., Sulkowski, E.J.:
J. Interferon Res. 2, 229, 1982
- Chang, T., Testa, D., Kung, P.C., Perry, L., Dreskin, H.J.,
Goldstein, G.:
J. Immunol. 128, 585, 1982
- Chatterjee, S., Hunter, E., Whitley, R.:
J. Virol. 56, 419, 1985
- Chebath, J., Benech, P., Revel, M., Vigneron, M.:
Nature 330, 587, 1987
- Cole, B.C., Thorpe, R.N.:
J. Immunol. 131, 2392, 1983
- Creasey, A.A., Bartholomew, J.C., Merigan, T.C.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1471, 1980
- Croll, A.D., Morris, A.G.:
Cell. Immunol. 102, 133, 1986.
- Czarnecki, C.W., Fennie, C.W., Powers, D.B., Estell, D.A.:
J. Virol. 49, 490, 1984
- Dale, T.C., Imam, A.M.A., Kerr, I.M., Stark, G.M.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 1203, 1989
- Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley,
A., Stewart, T.A.:
Science 259, 1739, 1993
- De la Maza, L.M., Peterson, E.M.:
Cancer Res. 48, 346, 1988
- De Ley, M., Van Damme, J., Claeys, H., Weening, H., Heine, J.W.,
Billiau, A., Vermynen, C., De Somer, P.:
Eur. J. Immunol. 10, 877, 1980
- De Maeyer E., De Maeyer-Guignard, J.:
Interferon an Other Regulatory Cytokines. Wiley-Intersci.
Publ. 1988

- Devos, R., Cheroutre, H., Taya, Y., Degrave, W., Van Heuverswyn, H., Fiers, W.:
Nucl. Acids Res. 10, 2487, 1982
- Dianzani, F., Monahan, T.M., Georgiades, J., Alperin, J.B.:
Infect. Immun. 26, 879, 1979
- Dianzani, F., Monahan, T.M., Georgiades, J., Alperin, J.B.:
Infect. Immun. 29, 561, 1980
- Djeu, J.Y., Stocks, N., Zoon, K., Stanton, G.J., Timonen, T., Herberman, R.B.:
J. Exp. Med. 156, 1222, 1982
- Dorr, R.T.:
Drugs 45, 177, 1993
- Edy, V.G., Braude, I.A., De Clercq, E., De Somer, P.:
J. gen. Virol. 33, 517, 1976
- Epstein, B.:
Nature 295, 453, 1982
- Ernstoff, M.S., Gooding, W., Nair, S., Bahnson, R.B.:
J. Cancer. Res. 52, 851, 1992
- Falcoff, R.:
J. gen. Virol. 16, 251, 1972
- Faltynek, C.R., Princler, G.L., Ortaldo, J.R.:
J. Immunol. 136, 4134, 1986
- Field, A.K., Tyttel, A.A., Lampson, G.P., Hilleman, M.R.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 1004, 1967
- Finbloom, D.S., Hoover, D.R., Wahl, L.M.:
J. Immunol. 135, 300, 1985
- Fleischmann, W.R., Georgiades, J.A., Osborne, L.C.:
Infect. Immun. 26, 248, 1979
- Freund, M., Wussow, P.V., Knüver-Hopf, J., Mohr, H., Pohl, U., Exeriede, G., Wike, H.J., Poliwoda, H.:
Blut 58, 311, 1988
- Friedman, R.M., Cooper, H.L.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 901, 1967
- Friedman, W.H., Gresser, I., Bandu, M.T., Aguet, M., Neauport-Sautes, C:
J. Immunol. 124, 2436, 1980

- Fujita, T., Reis, L.F., Watanabe, N.; Kimura, Y., Taniguchi, T.,
Vilcek, J.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 9936, 1989
- Fujita, T., Saito, S., Kohno, S.:
J. gen. Virol. 45, 301, 1979
- Goldfarb, R.H., Herbermann, R.B.:
J. Immunol. 126, 2129, 1981
- Golgher, R.P., Paucker, K.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 167, 1973
- Golub, S.M., Dorey, F., Hara, D., Morton, D.L., Burk, M.W.:
J. Natl. Cancer Inst. 68, 711, 1982
- Gray, P.W., Goeddel, D.V.:
Nature 298, 859, 1982
- Green, I.A.:
Science 164, 1415, 1969
- Gresser, I.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108, 303, 1961
- Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y., Kumagai, K.:
J. Immunol. 130, 988, 1983
- Hannigan, G.E., Lau, A.S., Williams, B.R.G.:
Eur. J. Biochem. 157, 187, 1986
- Hannigan, G.E., Williams, B.R.G.:
Science 251, 204, 1991
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Haruyama, M.,
Furia, A., Miyata, T., Taniguchi, T.:
Cell 58, 729, 1989
- Hauptman, R., Swetly, P.A.:
Nucl. Acids Res. 13, 4739, 1985
- Henco, K., Brosius, J., Fujisawa, A., Fujisawa, J.I., Haynes,
J.R., Hochstadt, J., Kovacic, T., Pasek, M., Schambock, A.,
Schmid, J., Todokoro, K., Walchli, M., Nagata, S., Weissmann,
C.:
J. Mol. Biol. 185, 227, 1985
- Heron, I., Berg, K., Cantell, K.:
J. Immunol. 117, 1370, 1976
- Ho, M.:
Interferon, Vol. 1, ed. A. Billiau, p. 79, 1984

Horowitz, B.:

Method. Enzymol. 119, 39, 1986

Houghleton, A.N., Thomson, T.M., Gross, D., Oettgen, H.F., Old, L.J.:

J. Exp. Med. 160, 255, 1984

Houghton, M., Jackson, I.J., Porter, A.G., Doel, S.M., Catlin, G.H., Barber, C., Carey, N.H.:

Nucl. Acids Res. 9, 247, 1981

Hovanessian, A.G., Wood, J., Meurs, E., Montagnier, L.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 3261, 1979

Huang, S., Hendriks, W., Altmage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., Aguet, M.:

Science 259, 1742, 1993

Isaacs, A., Lindenmann, J.:

Proc. R. Soc. (London) Ser. B, 147, 258, 1957

Ito, Y., Nishiyama, Y., Shimokata, K., Nagata, I., Takeyama, H., Kuniti, A.:

Virology 88, 128, 1978

Itoh, K., Inone, M., Kataoka, S., Kumagai, K.:

J. Immunol. 124, 2589, 1980

Jameson, P., Grossberg, S.E.:

Arch. Virol. 62, 209 1979

Johnson, H.M.:

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 138, 1977

Jung, V., Rashidbaigi, A., Jones, C., Tischfield, J.A., Shows, T.B., Pestka, S.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4151, 1987

Kantor, J., Tran, R., Greiner, J.:

Cancer Res. 49, 2651, 1988

Kasahara, T., Hooks, J.J., Dougherty, S.F., Oppenheim, J.J.:

J. Immunol. 130, 1784, 1983

Kauppinen, H.L., Bang, B., Eronen, J., Majuri, R., Myllyla, G., Tölö, H., Hirvonen, S., Cantell, K.:

The Biology of the Interferon System, eds. Stewart W.E.II, Schellekens H. Elsevier Sci. Publ., p. 221, 1986

- Kirby, P., Wells, D., Corey, L.:
Clin. Res. 34, 759A, 1986
- Kirchner, H., Peter, U.H., Hirt, H.M., Zawatzky, R., Dalügge, H.,
Bradstreet, P.:
Immunobiol. 156, 65, 1979
- Klimpel, G.R., Infante, A.J., Patterson, J., Hess, C.B., Asuncion,
M.:
Cell. Immunol. 128, 603, 1990
- Krug, R.M., Shaw, M., Broni, B., Shapiro, G., Haller, O.:
J. Virol. 56, 201, 1985
- Kung, H.F., Bekesi, E.:
Method. Enzymol. 119, 296, 1986
- Langford, M.P., Georgiades, J.A., Stanton, G.J., Dianzani, F.,
Johnson, H.M.:
Infect. Immun. 26, 36, 1979
- Le, J., Vilcek, J., Saxinger, C., Prensky, W.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7857, 1982
- Le, J., Yao, J.S., Henriksen-Destefano, D., Vilcek, J.:
The Biology of the Interferon System, 1985, eds. Stewart II,
W.E., Schellekens H. Elsevier Sci. Publ., p. 229, 1986
- Liao, S.K., Kwong, P.C., Kosravi, M.:
J. Natl. Cancer Inst. 68, 19, 1982
- Lindahl, P., Leary, P., Gresser, I.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 721, 1972
- Maluish, A.E., Ortaldo, J.R., Coulon, J.C., Sherwin, S.A.,
Leavitt, R., Strong, D.M., Wiernik, P., Oldham, R.K.,
Herberman, R.B.:
J. Immunol. 131, 503, 1983
- Marcus, P.I., Sekellick, M.J.:
J. gen. Virol. 47, 89, 1980
- Marcus, P.I., Svitlik, C., Sekellick, M.J.:
J. gen. Virol. 64, 2419, 1983
- Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Soh, J., Pestka, S.:
In: Interferons, Princ. and Med. Appl., eds. S. Baron et al.,
1992

- McNair, A.N.B., Kerr, I.M.:
Pharmac. Ther. 56, 79, 1992
- Mécs, I., Béládi, I.:
In: Proc. Symposium on Preparation, Standardization and
Clinical Use of Interferon, Yugoslav Acad. Sci. and Arts,
Zagreb; p. 23, 1977
- Michael, D., Larner, A.C.:
Science 257, 813, 1992
- Mogensen, K.E., Bandu, M.T., Vignaux, F., Aguet, M., Gresser, I.:
Int. J. Cancer 28, 575, 1981
- Mogensen, S.C., Virelizier, J.:
In: Interferon, ed. Gresser J., Acad. Press, p. 55, 1987
- Morris, A.G.:
Immunol. Suppl. 1, 43, 1988
- Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M.,
Ecsödi, J., Boll, W., Cantell, K., Weissmann, C.:
Nature 284, 316, 1980
- Nakane, A., Minagawa, T.:
J. Immunol. 126, 2339, 1981
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y.:
J. Exp. Med. 158, 670, 1983
- Nathan, C.F., Squires, K., Griffo, W., Lewis, W., Varghese, M.,
Job, C.K., Nusrat, A.R., Sherwin, S., Rappaport, S., Sanchez,
E., Burkhardt, R.A., Kaplan G.:
J. Exp. Med. 172, 1509, 1990
- Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Shows, T.B., Law, M.L., Goeddel,
D.V., Gray, P.W.:
J. Exp. Med. 57, 1020, 1983
- Obar, R.A., Collins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S.,
Vallee, R.B.:
Nature 347, 256, 1990
- Oleszak, E., Stewart, II, W.E.:
J. Interferon Res. 5, 361, 1985
- Ortaldo, J.R., Pestka, S., Slease, R.B., Rubinstein, M.,
Herberman, R.B.:
J. Immunol. 12, 365, 1980.

Osborne, L.C.:

Infect. Immun. 23, 80, 1979

Otto, U., Conrad, S., Schneider, A.W., Klosterhafen, A.:

Drug Res. 38, 1658, 1988

Owerbach, D., Rutter, W.J., Shows, T.B., Gray, D., Goeddel, D.V.,
Lawn, R.M.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3123, 1981

Ozaki, Y., Edelstein, M.P., Duch, D.S.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1242, 1988

Pace, J.L., Russell, S.W., Leblanc, P.A., Murasko, D.M.:

J. Immunol. 134, 977, 1985

Palacios, R.:

Eur. J. Immunol. 15, 645, 1985

Palmer, B.A., Hetrick, F.M., Jerrells, T.R.:

Infect. Immun. 46, 237, 1984

Paucker, K., Cantell, K., Henle, W.:

Virology 17, 324, 1962

Pavlovic, J.:

J. Virol. 66, 2564, 1992

Perussia, B., Dayton, E.T., Lazarus, S., Fanning, V., Trinchieri,
G.:

J. Exp. Med. 158, 1092, 1983

Pestka, S.:

Arch. Biochem. Biophys. 221, 1, 1983

Pestka, S.:

Method. Enzymol. 119, 845, 1986

Pestka, S., Baron, S.:

Method. Enzymol. 78, 3, 1981

Petroni, K.C., Shen, L., Guyre, P.M.:

J. Immunol. 140, 3467, 1988

Pfeffer, L.M., Eisenkraft, B.L., Reich, N.C., Improta, T., Baxter,
G., Daniel-Issakani, S., Strulovici, B.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 7988, 1991

Pfeffer, L.M., Strulovici, B., Saltier, A.R.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 6537, 1990

Pfefferkorn, E.R.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 908, 1984

Pitha, P.M., Fernie, B., Maldarelli, F., Hattman, T., Wivel, N.A.:

J. gen. Virol. 46, 97, 1980

Prümmer, O., Porzsolt, F.:

VI. European Interferon Workshop, Hannover; p. 20, 1991

Rashidbaigi, A., Langer, J.A., Jung, V., Jones, C., Morse, H.G.,

Tischfield, J.A., Trill, J.J., Kung, H., Pestka, S.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 384, 1986

Rasmussen, L.E., Jordan, G.W., Stevens, D.A., Merigan, T.C.:

J. Immunol. 112, 728, 1974

Reem, G.H., Yeh, N.:

Science 225, 429, 1984

Resnitzky, D., Tiefenbrun, N., Berissi, H., Kimchi, A.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 402, 1992

Rinderknecht, E., O'Connor, B.H., Rodriguez, H.:

J. Biol. Chem. 259, 6790, 1984

Roberts, N.J., Douglas, R.G., Simons, R.M., Diamond, M.E.:

J. Immunol. 123, 365, 1979

Rosenblum, M.G., Lamki, L.M., Murray, J.L.:

J. Natl. Cancer Inst. 80, 160, 1988

Rozenstreich, D.L., Mizel, S.B.:

J. Immunol. 123, 1749, 1979

Rosztóczy, I.:

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 23, 305, 1974

Rosztóczy, I., Mécs, I.:

Acta Virol. 14, 388, 1970

Rothman, J.H., Raymond, C.K., Gilbert, T., O'Hara, P.J., Stevens,

T.:

Cell, 61, 1063, 1990

Rubin, B.Y., Gupta, S.L.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 5928, 1980

Rubin, B.Y., Sekar, V., Martimucci, W.A.:

J. gen. Virol. 64, 1743, 1983

Rubinstein M., Rubinstein, S., Familletti, P.C., Gross, M.S.,

Miller, R.S., Waldman, A.A., Pestka, S.:

Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 643, 1979

- Ruggiero, V., Tavernier, J., Fries, W., Baglioni, C.:
J. Immunol. 136, 2445, 1986
- Saksela, E., Timonen, T., Cantell, K.:
Scand. J. Immunol. 10, 257, 1979
- Samuel, C.E.:
Virology 183, 1, 1991
- Sandvig, S., Laskay, T., Andersson, J., De Ley, M., Andersson, U.:
Immunol. Rev. 97, 51, 1987
- Santoni, A., Piccoli, M., Ortaldo, J.R., Mason, L., Wilttrout, R.H., Herberman, R.B.:
J. Immunol. 134, 2799, 1985
- Schofield, L., Ferreira, A., Altszuler, R., Nursenzweig, V., Nursenzweig, R.S.:
J. Immunol. 139, 2020, 1987
- Schüller, J.H., Witt P.L., Storer, B.:
Cancer 69, 562, 1992
- Shemer, Y., Sarov, I.:
Infect. Immun. 48, 592, 1985
- Siggins, K.W., Tinsley, J.M., Morris, A.:
Eur. J. Immunol. 15, 1079, 1985
- Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Mohler, K.M., Anderson, D., Reed, S.G.:
J. Exp. Med. 175, 169, 1992
- Sen, G.C., Lengyel P.:
J. Biol. Chem. 267, 5017, 1992
- Slate, D.L., Shulman, L., Lawrence, J.B., Revel, M., Ruddle, F.H.:
J. Virol. 25, 319, 1978
- Slate, D.L., D'Eustachio, P., Pravtcheva, D., Cunningham, A.C., Nagata, S., Weissmann, C., Ruddle, F.M.:
J. Exp. Med. 155, 1019, 1982
- Sréter, L., Fehér, J.:
Orv. Hetil. 132, 507, 1991
- Spangsberg, N., Heron, I.:
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C, 91, 315, 1983
- Staeheli, P., Pavlovic, J.:
J. Virol. 65, 4498, 1991

- Stark, G.H., Kerr, I.M.:
J. Interferon Res. 12, 147, 1992
- Steis, R.G., Smith, J.W., Urba, W.J., Clark, J.W., Loretta, M.I.,
Evans, L.M., Schoenberger, C., Longo, D.L.:
N. Engl. J. Med. 318; 1409, 1988
- Stewart, II., W.E.:
The Interferon System, Springer Verlag, 1979
- Stewart, II., W.E.:
Eur. J. Immunol. 10, 660, 1980
- Stewart, II., W.E.:
The Interferon System, Springer Verlag, 1981
- Strander, H.A.:
Acta Oncol. 28, 355, 1989
- Strander, H., Cantell, K.:
Ann. Med. Exp. Fenn. 44, 265, 1966
- Stüber, D., Fountoulakis, M., Garotta, G.,
In: Interferons, Princ. and Med. Appl., p. 139, 1992
- Talmadge, K.W., Gallati, M., Sinigaglia, F., Walz, A., Garotta, G.:
Eur. J. Immunol. 16, 1471, 1985
- Tan, V.H., Tischfield, J., Kuddle, F.H.:
J. Exp. Med. 137, 317, 1973
- Taniguchi, T.:
Nature 285, 547, 1980
- Taya, Y., Devos, R., Tavernier, J., Cheroutre, H., Engler, G.,
Fiers, W.:
EMBO J. 1, 953, 1982
- Thürman, G.B., Braude, I.A., Gray, P.W., Oldham, R.K., Stevenson, H.C.:
J. Immunol. 134, 305, 1985
- Tomida, M., Yamamoto, Y., Hozumi, M.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 30, 1982
- Torrence, P.F., De Clercq, E.:
In: Meth. Immunol., Vol. 78, ed. S. Pestka, Acad. Press, p. 291, 1981
- Tóth, M., Mécs, I., Tóth, S., Endrész, V., Béládi, I.:
Acta Microbiol. Hung. 31, 61, 1984

- Trent, J.M., Olson, S., Lawn, R.M.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7809, 1982
- Trotta, P.P., Nagabhushan, T.L.:
In: Interferon Principles and their Application, VI., eds. S. Baron et al., p. 117, 1992
- Tsien, R.Y., Pazzan, T., Rink, T.J.:
Nature 295, 68, 1982
- Tsujimoto, M., Yip, Y.K., Vilcek, J.:
J. Immunol. 136, 2441, 1986
- Ulker, N., Samuel, C.E.:
J. Biol. Chem. 260, 4324, 1983
- Ullberg, M., Jondal, M.:
J. Exp. Med. 153, 615, 1981
- Uze, G., Lutfalla, G., Gresser, I.:
Cell 60, 225, 1990
- Valle, M.J., Jordan, G.W., Haahr, S., Merigan, T.C.:
J. Immunol. 115, 230, 1975
- Váczi, L., Horváth, E., Hadházy, G.:
Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 12, 345, 1965
- Verhagen-Levalle, M., Kuwata, T., Zhang, Z.-X., De Clercq, E., Cantell, K., Content, J.:
Virology 117, 425, 1982
- Viens, P., Blaire, D., Stoppa, A.M.:
J. Immunother. 11, 218, 1992
- Vilcek, J., Henriksen-Destefano, D., Siegel, D., Klion, A., Robb, R.J., Le, J.:
J. Immunol. 135, 1851, 1985
- Wallach, D., Fellous, M., Revel, M.:
Nature 299, 833, 1982
- Weidle, U., Weissmann, C.:
Nature 303, 442, 1983
- Weigent, D.A., Langford, M.P., Fleischmann, W.R., Stanton, G.J.:
Infect. Immun. 40, 35, 1983
- Weil, J., Epstein, C.J., Epstein, L.B., Semak, J.J., Sabran, J.L., Grossberg, S.E.:
Nature 301, 437, 1983

- Welsh, R.M., Kärre, K., Hansson, M., Kunkel, L.A., Kiessling, R.W.:
J. Immunol. 126, 219, 1981
- Wheelock, E.F.:
Science 141, 310, 1965
- Whitaker-Dowling, P.A., Wilcox, D.K., Widnell, C.C., Youngner, J.S.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1083, 1983
- Williams, J.M., Ransil, B.J., Shapiro, H.M., Strom, T.B.:
J. Immunol. 133, 2986, 1984.
- Woodman, R.C., Erickson, R.W., Rae, J., Jaffe, H.S., Curmette, J.T.:
Blood 79, 1558, 1992
- Wussow, P.V., Jakschies, D., Freund, M., Rehlmann, R., Brockhaus, F., Hochkeppel, H., Horisberger, M., Deicher, M.:
Brit. J. Haematol. 78, 210, 1991
- Yamamoto, J.K., Farrar, W.L., Johnson, H.M.:
Cell. Immunol. 66, 333, 1982
- Yan, X., Wong, J.Y.C., Esteban, J.M., Kuhn, J.A., Beatty, B.G., Beatty, J.D., Shively, J.E.:
J. Immunother. 11, 77, 1992
- Yap, W.H., Teo, T.S., McCoy, E., Tan, Y.H.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 7765, 1986
- Yip, Y.K., Barrowclough, B.S., Urban, C., Vilcek, J.:
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 1820, 1982
- Yip, Y.K., Pang, R.H.L., Oppenheim, J.D., Nachbar, M.S., Henriksen, D., Zerebeckyj-Eckhardt, I., Vilcek, J.:
Infect. Immun. 34, 131, 1981
- Young, H.A., Hardy, K.J.:
Pharmac. Ther. 45, 137, 1990
- Youngner, J.S., Salvin, S.B.:
J. Immunol. 111, 1914, 1973
- Zoon, K.C., Bekisz, J., Miller, D.:
In: Interferon Principles and their Application, IV., eds. S. Baron et al., p. 95, 1992

SZENT-GYÖRGYI ALBERT
ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
ALTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KARÁNAK
DÉKÁNJA

Szeged, Zrínyi u. 9.

Telefon: 12-529

ALBERT SZENT-GYÖRGYI
MEDICAL UNIVERSITY
DEAN OF FACULTY OF GENERAL MEDICINE
6701 Szeged, Hungary

73-18/1993. ÁOK. szám

Dr. Zallár Andor Urnak
igazgató

SZOTE Központi Könyvtár

D'Neurokenc¹
PJ. XI.22
Q

Tisztelt Igazgató Ur!

Könyvtári használatra mellékelten megküldöm

Vizler Csaba "Graft-versus-host betegség előidézésének és
prevenciójának lehetőségei egerekben" és

Endrész Valéria "Humán interferon-gamma termelése, tisztítá-
sa és jellemzése" című univ. doktori disszertációjukat.

Szeged, 1993. november 22.

Tisztelettel:

Dr. Lednitzky Andor
dékáni hivatal

