

## **In vitro-Untersuchungen mit menschlichem Transferfaktor**

Hugo Rainer und Kurt Moser

### Zusammenfassung

Menschlicher Transferfaktor wurde aus Speckhaut menschlicher Leukozyten durch Ultrafiltration gewonnen und die Wirkung auf die Lymphblastogenese in vitro untersucht. Dabei fand sich eine Steigerung der Antigen(Mitogen)-induzierten Blastentransformation um das 2fache. Fraktionierung der erhaltenen Transferfaktorpräparation auf Sephadex G-10 oder DEAE-Zellulose ergab durchwegs eine mehrgipfelige Kurve. Die Zugabe der einzelnen Subfraktionen von Transferfaktor zu Lymphozyten in vitro zusammen mit Antigen (Mitogen) führte bei einzelnen Fraktionen zu einer Hemmung, bei anderen zu einer Aktivierung der Lymphblastogenese. Es kann daher angenommen werden, daß bei der Substanz Transferfaktor heterogene chemische Moleküle vorliegen, wobei einerseits aktivierende, andererseits auch hemmende Substanzen der Lymphblastogenese als Gemisch vorliegen.

### Summary

Human transfer factor was prepared from "buffy coat" of human donors by ultra filtration. These batches of transfer factor were tested for their ability to increase DNA-synthesis of antigen(mitogen) incubated lymphocytes. An increase of DNA-synthesis was measured by the ratio of appr. 2. Column chromatographic separation of transfer factor on sephadex G-10 or DEAE cellulose columns showed an elution pattern with many peaks. In the lymphblastogenese assay some peaks were found to be stimulatory, others in contrast inhibitory. It seems likely from our results that transfer factor represents a mixture of different chemical compounds with activating or inhibitory action on lymphblastogenesis.

Key words: Human transfer factor, DNA-synthesis.

### Abkürzungen:

PHA	Phytohämagglutinin	PWM	Pokeweed Mitogen
PPD	Purifiziertes Protein-Derivat von Tuberkulin	TF	Transferfaktor
		MEM	Minimum Essential Medium

Die Fähigkeit von menschlichem Transferfaktor, Mechanismen der zellulären Immunität auf einen nicht-sensibilisierten Empfänger zu übertragen, wurde seit der Erstveröffentlichung durch *Lawrence* 1963 von vielen Arbeitsgruppen bestätigt

---

Eingegangen am 19. 10. 1976

[4-8, 10, 11]. Weitergehende Charakterisierungen und Austestungen *in vitro* haben ergeben, daß beim Transferfaktor (TF) ein Gemisch von Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter 10000 vorliegt, die in aktive und weniger aktive Komponenten aufgeteilt werden können [3, 10]. Von *Ascher* et al. [1] wurde eine Nachweismethode entwickelt, bei der menschliche Lymphozyten PPD-negativer Spender mit PPD und Transferfaktor von PPD positiven Spendern inkubiert wurden. Dabei wurde eine Transferfaktordosis-abhängige Steigerung der PPD-induzierten Lymphoblastogenese beobachtet. Da wir uns bemühten, einen tragfähigen *in-vitro*-Ansatz zum zweifelfreien Nachweis von Transferfaktor aufzubauen, haben wir das zitierte Testmodell aufgegriffen.

Ein spezifischer Test für Transferfaktor wäre auch allein schon deshalb von besonderem Interesse, da ein solcher Test für die von uns angestrebte Abklärung der chemischen Natur dieser Substanz und der weitergehenden Anreicherung eine unabdingbare Voraussetzung darstellt. Aufgrund unserer in den Ergebnissen dargestellten Befunde konnten wir in der Folge zeigen, daß die Befunde von *Ascher* [1] zwar prinzipiell richtig sind, daß aber die Erwartungen dieses Nachweises als spezifischer *in-vitro*-Test für TF in keiner Weise erfüllt werden konnten, da für das Testmodell in unseren Versuchsanordnungen keinerlei Spezifität nachgewiesen werden konnte. Darüberhinaus bestehen auch Anhaltspunkte, daß dieses Modell mit gewissen klinischen Beobachtungen nicht korrelierbar ist.

## Material und Methode

### Gewinnung von menschlichem Transferfaktor

Menschliche Lymphozyten wurden mittels eines Zellseparators (Aminco, USA) gewonnen. Die durch den Separator gewonnenen Zellen wurden mit 2 vol. aqua ad injectionem versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend daran wurden die Zellen bei Zimmertemperatur aufgetaut und wieder eingefroren. Dieser Vorgang wurde 6mal wiederholt, um eine möglichst weitgehende Aufschließung der gewonnenen Zellen zu erreichen. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine Ultrafiltrationszelle (Amicon 2000 C, Filter Amicon PM-10) eingefüllt und ultrafiltriert. Das Ultrafiltrat wurde lyophilisiert und in aqua ad injectionem gelöst. Die Lösung wurde durch ein Bakterienfilter in Durchstichflaschen abgefüllt und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Präparationsschritte wurden unter sterilen oder keimarmen Bedingungen durchgeführt. Die Lösung wurde so eingestellt, daß 1 ml Lösung einer Menge von  $10^9$  Leukozyten entsprach.

### Durchführung der Kurzzeitlymphozytenkulturen

Die Methode der Kurzzeitlymphozytenkultur wurde von *Eijssvoogel* et al. [2] im Detail beschrieben. Die Lymphozyten werden dabei mit einem Ficoll-Isopaque Gradienten isoliert und in Mikrotiterplatten kultiviert. Pro Tüpfel wurden ca. 100000 Zellen angesetzt. Das Kulturmedium bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium, versetzt mit 1% Glutamin, 10% Kalbsserum und 2% Penicillin-Streptomycin. Die Ernte erfolgte mit dem Mash II der Fa. Microbial Assoc.

Ergebnisse

In-vitro-Untersuchungen mit Transferfaktor

a) Säulenchromatographisches Verhalten

Die ersten säulenchromatographischen Trennungen von Transferfaktor wurden von Lawrence et al. 1963 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die aktive Komponente von Transferfaktor erst im Anschluß an das Trennvolumen der Säule eluiert werden kann, d. h. durch Sephadex deutlich verzögert wird. Das chromatographische Verhalten der von uns hergestellten Präparation war ähnlich.

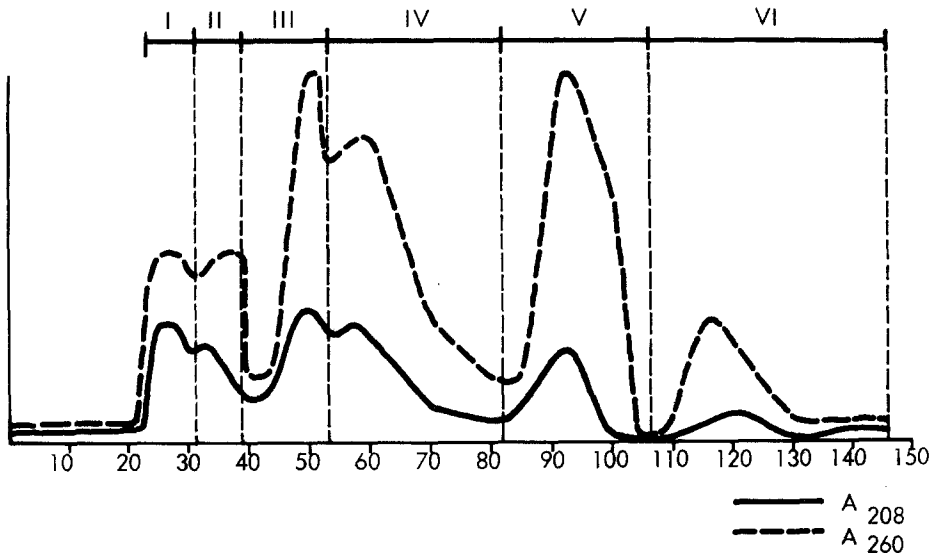


Abb. 1: Verhalten von Transferfaktor auf Sephadex G-10. 4 ml der Transferfaktorpräparation wurden auf eine 3 cm × 60 cm Säule aufgetragen und mit Elutionspuffer, TRIS HCL pH 7,0, 0,15 m KCL, 0,0005 m Mercaptoäthanol eluiert.

Säulencharakteristika:  $V_0$  bis Fraktion 21 (mit Dextranblau und Cytochrom C),  $V_t$  bis Fraktion 89 (mit DNP-Alanin bestimmt).

Die einzelnen Fraktionen wurden entsprechend der Abbildung gepoolt, lyophilisiert und wieder in Wasser gelöst. Sie werden in der Folge als Sephadex I-VI bezeichnet.

Es ergaben sich auf Sephadex G-25 4 Gipfel, auf Sephadex G-10 6 Gipfel, wobei ein Teil des UV-Licht absorbierenden Materials erst nach  $5/4 V_t$  aufgefunden wurde (Abb. 1). Die Chromatographie auf DEAE-Zellulose ergab nur 3 Peaks. Entsprechend den in den Abbildungen angegebenen Bereichen wurden die Chromatogramme unterteilt und in den einzelnen Abschnitten gepoolt. Jeder Pool wurde entsprechend seiner Elutionsfolge von der Säule numeriert und daraus eine entsprechende Bezeichnung der einzelnen Transferfaktorsubfraktionen hergeleitet. Gemeinsam ist allen einzelnen Fraktionen, daß ORCINOL-reaktives Material (Nukleinsäuren?) und LOWRY-positives Material (Proteine?) nachgewiesen werden konnte, ein Befund, der mit den Literaturangaben, daß es sich bezüglich der aktiven Komponente von Transferfaktor um ein Nukleoprotein handeln könnte, vereinbar ist [7].

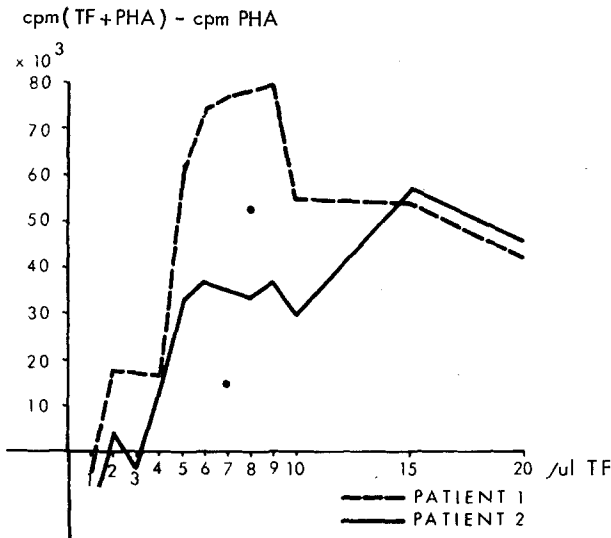


Abb. 2: Lymphozytentransformation durch PHA (0,5 µg/Tüpfel) und Transferfaktor. Dabei wurden Lymphozyten in Mikrotiterplatten (ca. 100000 Lymphozyten/Tüpfel) kultiviert. Nach Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin wurden die Kulturen mit einem Mash II geerntet und die Radioaktivität bestimmt. Von jeder Probe wurde der Leerwert abgezogen, der durch Inkubation mit PHA alleine erhalten wurde. Auf der Abszisse sind die verwendeten Transferfaktorkonzentrationen aufgetragen, auf der Ordinate die ermittelten cpm.

#### b) Steigerung der Lymphozytentransformation durch Transferfaktor

Ascher et al. [1] konnten zeigen, daß gegen Medium dialysierter Transferfaktor in der Lage ist, die in-vitro-Transformation von Lymphozyten ausgelöst durch PPD zu aktivieren. In Bestätigung und Erweiterung dieser ursprünglichen Befunde können wir von unserer Transferfaktorpräparation zeigen, daß sowohl die durch das Antigen ausgelöste Stimulation als auch die durch Phytohaemagglutinin (PHA) oder Pokeweed Mitogen (PWM) initiierte Lymphozytenstimulation in signifikanter Weise gesteigert wird (Tab. 1), bei einzelnen Patienten ergab sich unter der Ver-

	ohne Transferfaktor	mit Transferfaktor
LY + PHA	100%	194 ± 58*
LY + PWM	100%	154 ± 18*
LY + PPD	100%	179 ± 28*

\* Statistisch signifikant nach Whitney-Man U-Test ( $p < 0,001$ ).

Tab. 1: Steigerung der Lymphozytentransformation in Anwesenheit eines Antigens oder Mitogens durch Transferfaktorzugabe.

Lymphozyten wurden in Mikrotiterplatten in MEM mit und ohne Zusatz von Transferfaktor kultiviert. 24 h vor der Beendigung der Kultur wurde  $^3\text{H}$ -Thymidin zugesetzt. Als 100% wurde der Wert angenommen, der sich aus der Radioaktivität der mit Mitogen/Antigen versetzten Probe ergab. Jede Versuchsanordnung wurde mit 5 verschiedenen Spendern wiederholt. Transferfaktor wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von  $10^4$  bis  $2 \times 10^6$  Leukozytenäquivalenten zugegeben. Zur Auswertung wurde jeweils jene Transferfaktordosierung herangezogen, die zu einer optimalen Stimulation führte.

wendung des Mitogens PHA eine nahezu dosisabhängige-Beziehung zwischen der Aktivierung der Lymphozytentransformation durch Transferfaktor + PHA in bezug auf die verwendete Transferfaktormenge (Abb. 2).

Transferfaktorzugabe zu kultivierten Lymphozyten ohne Antigen oder Mitogen führt hingegen zu keiner signifikanten Lymphozytenstimulation.

Untersuchungen der Spezifität dieser Aktivierung der Lymphozytentransformation von PPD + TF gegenüber PPD allein ergaben, daß die Aktivierung zwar Antigen-abhängig aber nicht Antigen-spezifisch abläuft. Wie aus der Tab. 2 ersehen werden kann, ist die Aktivierung der Transformation PPD-positiver Lymphozyten durch PPD + TF völlig analog, ob der Transferfaktorspender nun PPD-positiv oder negativ ist, dasselbe gilt auch sinngemäß für PPD-negative Lymphozyten. Diese Befunde legen daher den Verdacht nahe, daß bei der in-vitro-Aktivierung der Lymphozytenstimulierbarkeit keinerlei spezifische Effekte auftreten, sondern lediglich eine Adjuvans-ähnliche Eigenschaft von Transferfaktor vorliegt, und daß das vorliegende in-vitro-Modell daher auch keinerlei Schlüsse zuläßt, ob Transferfaktor nun tatsächlich de novo Immunität induzieren kann, oder ob lediglich unspezifisch gewisse Immunreaktionen aktiviert werden.

In weiteren Studien wurde am Modell der Aktivierung Lymphozyten + PHA + TF gegenüber Lymphozyten + PHA ohne Transferfaktor getestet, welche chromatographisch angereicherten Fraktionen für die Adjuvans-ähnliche Steigerung der Lymphozytentransformation verantwortlich sind. Für die Sephadexfraktionen ergab sich eine in-vitro-Beeinflussung der Lymphozytenstimulierbarkeit von Fraktion I bis IV, während von den DEAE-Fraktionen nur II und III wirksam waren (Tab. 2).

LY + PHA	100%
LY + PHA + TF Sephadex I	164%
LY + PHA + TF Sephadex II	136%
LY + PHA + TF Sephadex III	178%
LY + PHA + TF Sephadex IV	139%
LY + PHA + TF Sephadex V	87%
LY + PHA + TF Sephadex VI	40%
LY + PHA + TF DEAE I	69%
LY + PHA + TF DEAE II	189%
LY + PHA + TF DEAE III	148%

Tab. 2: Steigerung der Lymphozytentransformation durch Subfraktionen von Transferfaktor.

Die in Abb. 1 und Abb. 2 näher bezeichneten Subfraktionen von Transferfaktor wurden entsprechend der gezeigten Abbildung gepoolt, lyophilisiert, filtriert und Lymphozytenkulturen gesunder Spender zugesetzt, die Versuchsanordnung und Berechnung entspricht den Angaben in der Tab. 1. (Mittelwerte aus zumindest 3 Versuchen.)

In der Folge wurden die Bedingungen der Aktivierung der Lymphozytenblastogenese durch Transferfaktor studiert. Die Aktivität wird durch Kochen der Substanz zerstört. Wie *Fundenberg* et al. [11] feststellen konnten, wird eine Zerstörung auch durch Pronase bewirkt, während RNase, DNase, oder Chymotrypsin die Transferfaktorwirkung nicht beeinflussen.

## In-vivo-Untersuchungen mit Transferfaktor

## a) Konversion der Hautreaktion

Bei einigen Patienten mit Malignomen und septischen Erkrankungen konnte gezeigt werden, daß unter der Transferfaktortherapie eine Konversion der Hautreaktion auftritt. Es erschien uns in diesem Zusammenhang darüberhinaus interessant zu prüfen, ob auch Transferfaktorsubfraktionen in der Lage wären, eine ähnliche Konversion der Hautreaktion zu bewirken. Aus praktischen Überlegungen wurde ein Patient mit M. Hodgkin IV und anergen Hauttesten herangezogen, bei dem Transferfaktorsubfraktionen (Sephadex 1-6) mit PPD vermischt wurden und die lokale Rötung 48 h nach intrakutaner Verabreichung ausgemessen wurde. Das Ausmaß der Rötung wurde als relatives Maß für die lokale Konversion der Hautreaktion angesehen. Überraschenderweise und entgegen vielen Literaturangaben wurde die stärkste Rötung mit mittleren Sephadexfraktionen (besonders III, IV) erzielt, während Fraktion VI weniger aktiv war (Tab. 3).

Intrakutan	Größe der Rötung in mm nach 48 h
TF	3
PPD	—
PPD + Sephadex I	5
PPD + Sephadex II	8
PPD + Sephadex III	11
PPD + Sephadex IV	12
PPD + Sephadex V	5
PPD + Sephadex VI	9

Tab. 4: „Lokale Konversion“ der Hautreaktion gegenüber Tuberculin bei einem „anergen“ Hodgkin-Stadium IV-Patienten.

Intrakutan wurden jeweils Transferfaktor allein, PPD und PPD gemischt mit Transferfaktorsubfraktionen verabreicht. Die entstandene Rötung wurde nach 48 h ausgemessen.

## Besprechung

Überblickt man die Ergebnisse, so gewinnt man den Eindruck, daß bei der Substanz „Transferfaktor“ ein Gemisch unterschiedlichster chemischer Bestandteile vorliegt. Es ist dabei durchaus anzunehmen, daß für die beobachteten klinischen Veränderungen nur ganz wenige oder auch nur eine definierte Substanz verantwortlich gemacht werden kann. Es erscheint daher als logische Konsequenz, daß eine ganze Reihe von Arbeitsgruppen sich bemühte, Transferfaktor zu fraktionieren und die Fragmente einzeln funktionell und chemisch zu definieren. In diesem Zusammenhang und auf Grund funktioneller Studien wurde von einzelnen Arbeitsgruppen besonders die Meinung favorisiert, daß die aktive Komponente erst nach dem Trennvolumen der Sephadexsäule eluiert werde. Aus diesem Grunde wurde diesem letzten Peak besondere Aufmerksamkeit gewidmet, wobei auch die Zusammensetzung dieser Fraktion von 2 Arbeitsgruppen sehr eingehend studiert wurde. Die erste Arbeitsgruppe [3] kam zu dem Schluß, daß es sich dabei um ein kleines Molekül ohne jeglichen Informationsgehalt mit dem Molekulargewicht um 1000,

nämlich um Uracil handeln müsse. Die zweite Arbeitsgruppe hat diese Befunde im Prinzip bestätigt, als aktives Molekül wurde jedoch Hypoxanthin ermittelt [10].

Diesen Ergebnissen wurde vielfach widersprochen und auch unsere eigenen Untersuchungen legen eher andere Schlüsse nahe. Prinzipiell erscheint es einmal undenkbar, daß für die für Transferfaktor geforderte Spezifität Uracil oder auch Hypoxanthin in Frage kommt. Hypoxanthin und Uracil haben als einfache Moleküle keinen Informationsgehalt. Zum anderen erscheint uns eine Fraktionierung und Charakterisierung von Transferfaktorsubfragmenten als äußerst problematisch und auch möglicherweise undurchführbar, so lange kein spezifisches in-vitro-Modell zum eindeutigen Nachweis von Transferfaktor zur Verfügung steht. Alle positiven und unter Umständen tragfähigen Beobachtungen stützen sich nur auf klinische Befunde und therapeutische Erfolge, wobei diesbezüglich vielfach der Vorwurf erhoben werden muß, daß kontrollierte klinische Studien fehlen. Analysiert man unsere eigenen in-vitro-Befunde, so kommt man zum Schluß, daß die Aktivierung der Lymphoblastogenese durch Transferfaktor zwar Antigen-abhängig, aber nicht Antigen-spezifisch abläuft. Dieses Modell ist also, wie bereits eingangs erwähnt, kein spezifischer und tragfähiger in-vitro-Test für Transferfaktor. Wie jedoch deutlich ersichtlich, liegen bei der Substanz Transferfaktor einerseits Substanzen vor, die zu einer Aktivierung der Lymphoblastogenese als auch zu einer Hemmung derselben führen können. Hypoxanthin oder Uracil würden nun säulenchromatographisch niemals in Bereichen eluiert werden, in denen wir eine Aktivierung der Lymphoblastogenese (die mittleren Sephadexfraktionen und DEAE II + III) beobachteten. So würde man in unserer Versuchsanordnung eine Elution von Hypoxanthin oder Uracil von Sephadex G-10 etwa bei Peak V oder VI erwarten, also in einem Bereich, wo wir eine Hemmung der Lymphoblastogenese beobachten konnten. Auch die beobachtete lokale Konversion der Hautreaktion erscheint eher durch die mittleren Sephadexfraktionen vermittelt, als durch Peak V oder VI. Darüberhinaus könnten unsere Ergebnisse auch noch dazu beitragen, unterschiedliche Angaben in der Literatur zu klären. Während die Vielzahl der Untersucher angibt, daß Transferfaktor – wie auch in unseren eigenen Experimenten – die Lymphoblastogenese in der Art einer Adjuvans-ähnlichen Reaktion aktiviert, gibt es auch Befunde, die das Gegenteil, nämlich eine Hemmung von Transferfaktor in vitro beobachten konnten. Wie unsere chromatographischen Trennungen nun aufzeigen konnten, liegen Fraktionen vor, die die Lymphoblastogenese aktivieren, als auch solche, die die Lymphoblastogenese hemmen. Da nun jede Charge Transferfaktor nicht in reproduzierbarer Weise hergestellt werden kann, ist es denkbar, daß zwischen den einzelnen Präparationen Unterschiede bestehen. In unseren eigenen Präparationen war trotz gleicher Bezugsgröße, nämlich der Leukozytenzahl  $1 \times 10^9$ , der RNA- und Proteingehalt jeder Charge unterschiedlich, wobei auch ganz beträchtliche Schwankungen beobachtet wurden. Dasselbe Phänomen kann auch bezüglich des säulenchromatographischen Verhaltens beobachtet werden. Die Höhe und der Gehalt der einzelnen Peaks an RNA oder Protein ist bei jeder Charge unterschiedlich, wobei die Gipfel auch verschiedene Relationen zueinander zeigen. Alle unsere in-vitro-Ergebnisse wurden bisher mit ein- und derselben Charge erhoben. Er erscheint uns als durchaus möglich, daß mit einer anderen Charge unterschiedliche Befunde ermittelt würden.

Die großen Probleme mit der Substanz Transferfaktor bezüglich tragfähiger in-vitro-Modelle, einer standardisierten Herstellung und Objektivierung einzelner Befunde sollten daher dazu führen, bessere Methoden in der Herstellung und Charakterisierung anzustreben.

Die Untersuchungen wurden durch den Österreichischen Forschungsrat (Projekte 1477, 2577, M-2) unterstützt.

#### Literatur

1. Ascher M. S., Schneider W. J., Valentine F. T. & Lawrence H. S.: In vitro properties of leukocyte dialysates containing transfer factor. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 71, 1178 (1974).
2. Du Bois M. J. G. J., Huismans D. R., Schellekens T. A. & Eijsvogel V. P.: Investigation and standardization of the conditions for microlymphocyte culture. *Tiss. Ant.* 3, 402 (1973).
3. Krohn K., Uotila A., Grohn P., Väisänen J. & Hiltunen K. M.: Studies on the biological and chemical nature of a component in transfer factor with immunological non specific activity. In: Ascher M. S., Gottlieb A. A. & Kirkpatrick C. H. (ed.): *Transfer Factor*. Academic Press p. 283 (1976).
4. Lawrence H. S., Rapaport F. T., Converse J. M. & Tillet W. S.: Transfer of delayed hypersensitivity to skin homografts with leucocyte extracts in man. *J. clin. Invest.* 39, 185 (1960).
5. Lawrence H. S., Al-Askari S., David J. R., Franklin E. C. & Zweiman B.: Transfer factor. *Trans. Ass. Amer. Physcs.* 76 (1963) 84.
6. Lawrence H. S. & Landy M.: *Mediators of cellular immunity*. Academic Press N. Y. p. 145 (1969).
7. Lawrence H. S.: *Summation in Transfer Factor*. Ascher M. S., Gottlieb A. A., & Kirkpatrick C. H. (ed.) Academic Press (1976).
8. Moudgil G. C. & Wade A. G.: Anaesthesia and immunocompetence. *Brit. J. Anaesth.* 48, 31 (1976).
9. Mueller-Eckhardt Ch. & Ritts R. E. jr.: Inhibitory Activity of medium dialysed transfer factor on lymphocyte blastogenesis. *Blut* 32, 353 (1976).
10. O'Dorisio M. S., Neidhart J. A. & Lo Buglio A. F.: Identification of hypoxanthin as the major component of chromatographically prepared transfer factor. In: *Transfer factor*. Academic Press, p. 283 (1976).
11. Welch T. M., Wilson G. B. & Fudenberg H. H. Human transfer factor in guinea pigs: further studies. In *Transfer Factor*. Academic Press, p. 399 (1976).

Anschr. d. Verf.: Dr. H. Rainer, Prof. Dr. K. Moser, I. Medizinische Universitätsklinik, 1090 Wien, Lazarettgasse 14.