

Struktur und Wirkung von Interferonen

H. JACOBSEN

Einleitung

Die Interferone lassen sich begrifflich und geschichtlich auf Untersuchungen zur „viralen Interferenz“ zurückführen, die ca. 1955 von A. Isaacs und J. Lindenmann durchgeführt wurden. Virale Interferenz ist eine frühe Beobachtung in der virologischen Forschung; sie besagt, daß in vielen Virus-Wirtssystemen, Zellkultur oder Organismen, eine primäre Infektion mit Virus A eine nachfolgende Infektion mit Virus A oder nicht verwandtem Virus B, C, D hemmt. Dieser Hemmung können verschiedene Ursachen zugrunde liegen; Virus A kann z. B. den Oberflächenrezeptor für homologes oder heterologes Virus inaktivieren und somit den ersten Schritt der Virus-Zellbeziehung, die Adsorption des Virus an die Zellmembran, blockieren oder Virus A kann defekte interferierende Partikel bilden, welche selbst nicht mehr zur Replikation befähigt sind, aber die Replikation des homologen Wildtypvirus hemmen. In ihrem klassischen Experiment demonstrierten Isaac und Lindenmann eine weitere Form der Interferenz, die sich auf einen löslichen Faktor im Kulturüberstand virus-infizierter Zellen zurückführen ließ [45]. Sie infizierten Hühnereimembranen mit inaktiviertem Influenzavirus und inkubierten diese für wenige Stunden bei 37°C. Danach übertrugen sie den Kulturüberstand auf frische Hühnereimembranen, inkubierten diese für mehrere Stunden in dem Überstand und infizierten sie anschließend mit aktivem Influenzavirus. Sie beobachteten, daß in so vorbehandelten Membranen die Virusvermehrung erheblich vermindert war. Eine solche Hemmung wurde nicht gefunden, wenn die Inkubation in Überständen von Membranen erfolgte, die nicht mit Virus behandelt waren. Isaac und Lindenmann schlossen aus diesen Befunden, daß Virus, in diesem Fall auch inaktives Virus, in infizierten Zellen die Bildung eines Faktors induziert, der sezerniert wird und in uninfizierten Zellen eine Resistenz gegen eine nachfolgende Virusinfektion bewirkt, d. h., mit Virusvermehrung interferiert. Folgerichtig wurde dieser Faktor Interferon benannt. Nachfolgende Untersuchungen etablierten schnell einige grundlegende Eigenschaften des Interferons

- a) Interferon ist ein Protein,
- b) Interferon hat keine Virusspezifität, d. h., durch Virus A induziertes Interferon hemmt Virus B, C, D und umgekehrt,
- c) Interferon ist artspezifisch, z. B., von Hühnerzellen produziertes Interferon hat keine Schutzwirkung auf menschliche Zellen.

Hieraus folgte, daß das eigentliche Ziel des Interferons nicht das Virus selbst ist, sondern die Zelle, die durch Interferon in eine Abwehrbereitschaft gegen Virusinfektion versetzt wird.

Diese Basiskriterien eines Interferons – Protein, nicht virusspezifisch, aber artspezifisch – gelten heute noch, aber sind nachfolgend durch einige Zusatzkriterien ergänzt worden: Die antivirale Wirkung darf nicht auf Zelltoxizität zurückzuführen sein, die Ausprägung der antiviralen Aktivität erfordert RNA und Proteinsynthese, Interferone können das Zellwachstum hemmen und Interferone können ihre eigene Produktion positiv und negativ beeinflussen (priming, blocking).

Historisch gesehen folgte der Erstbeschreibung des Interferons eine Periode von fast zwei Jahrzehnten, in denen die Interferonforschung nur zögernde Fortschritte machte. Diese relative Stagnation läßt sich rückblickend damit erklären, daß keine effizienten Methoden zur Interferonproduktion und Reinigung gefunden wurden und somit kein hinreichend definiertes Material für die Forschung zur Verfügung stand. Diese Situation hat sich im vergangenen Jahrzehnt grundlegend geändert. Die Interferone – es gibt nicht ein Interferon, wie ursprünglich angenommen, sondern eine ganze Gruppe – und ihre Gene sind im Detail beschrieben worden; Interferone lassen sich gentechnisch in praktisch unbegrenzten Mengen herstellen und durch moderne Methoden der Proteinreinigung als Reinsubstanzen darstellen. Für die forschungs- und anwendungsrelevanten Interferontypen stehen monoklonale Antikörper bzw. spezifische Antiseren zur Verfügung, die für Reinigung, quantitative Bestimmung und Wirkungsbeschreibung eingesetzt werden können. Der gegenwärtig begrenzende Faktor bei der therapeutischen Anwendung der Interferone ist nicht ihre Verfügbarkeit, sondern das noch begrenzte Wissen um ihre Aktivitäten und deren Mechanismen.

Klassifizierung, Biochemie und Genetik der Interferone [54]

Die bislang charakterisierten Interferone lassen sich anhand einer Anzahl von Kriterien eindeutig in drei Klassen einteilen: Interferon- α (IFN- α), Interferon- β (IFN- β) und Interferon- γ (IFN- γ). Die wesentlichen Kriterien der historischen Einteilung waren Antigenität, typische Produzentenzellen, typische Induzenten und biochemischen Eigenschaften wie Stabilität gegenüber Säurebehandlung und Detergenzien. Die typischen Produzentenzellen führten auch zu der historisch gebräuchlichen Einteilung in Leukocyteninterferon (IFN- α), Fibroblasteninterferon (IFN- β) und Immuninterferon (IFN- γ). Wie später ausgeführt werden wird, stimmt dieses Konzept einer typischen Produzentenzelle nur sehr bedingt und diese Bezeichnungen sind daher eher irreführend. Das Prinzip der Einteilung in die drei Klassen hat jedoch seine Rechtfertigung durch die molekularbiologische Charakterisierung der Interferone erhalten, welche aufgrund völlig anderer Kriterien – i. e., die DNA-Sequenzen – die Dreiteilung in IFN- α , - β , und - γ bestätigte (Tabelle 1). In den folgenden Abschnitten sollen die Protein- und Genstruktur der Interferone

Tabelle 1. Einteilung der Interferone

Interferontyp	α	β	γ
Anzahl der Interferone	15	1	1
Molekulargewicht	ca. 19 000d	ca. 24 000d	ca. 45 000d (Dimer)
Chromosom	9	9	12
Rezeptortyp	I	I	II
Induzenten	- Viren - bakterielle Produkte - Synthetische Induzenten	- Viren - bakterielle Produkte - Synthetische Induzenten	- T-Zell-Mitogene - Antigene
Produzentenzelle	- Leukocyten - Fibroblasten - andere?	- Leukocyten - Fibroblasten - andere?	- T-Zellen

beschrieben werden. Diese Beschreibung beschränkt sich im wesentlichen auf das Interferonsystem des Menschen. In ihren grundlegenden Aussagen gilt sie jedoch auch für andere bislang charakterisierte Spezies, z. B. Maus, Ratte, Rind.

Interferon- α

Das IFN- α ist der komplexeste Interferontyp, da er im Gegensatz zu den anderen nicht aus einer Spezies besteht, sondern aus einer Gruppe engverwandter Proteine. Dieser Befund ergab sich zuerst aus der Reinigung des IFN- α aus induzierten Leukozytenkulturen mittels hochauflösender chromatographischer Methoden und Bestimmung der Amino-terminalen Proteinsequenzen der aufgetrennten Subtypen. Er wurde wenig später durch molekularbiologische Analysen bestätigt, die zu der Identifizierung verschiedener IFN- α -Gene führten. Diese Gene weisen Unterschiede in ihrer Basensequenz auf, die zu einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz der korrespondierenden Proteine führen. Es handelt sich somit bei den Subtypen des IFN- α nicht um sekundäre Modifikationen eines einheitlichen Ausgangsproteins, sondern um unabhängige Produkte einer Gruppe verwandter Gene. Bislang sind ca. 15 Gene identifiziert worden, die für funktionelle Proteine kodieren könnten. Weiterhin wurden einige „Pseudogene“ des IFN- α gefunden. Dies sind solche Gene, deren Sequenz durch Mutation wie Einbringung eines Stopkodons im Leserahmen bzw. Verschiebung des Leserahmens durch Insertion/Deletion von Basen so verändert wurde, daß die korrespondierende mRNA nicht mehr für ein funktionelles Protein kodiert.

Die Aminosäuresequenzen der IFN- α weisen untereinander ein hohes Maß an Homologien auf. Das biologisch aktive, sezernierte Protein besteht primär aus 165 bis 166 Aminosäuren. Von diesen sind ca. 50% identisch in den verschiedenen Subtypen und viele der Sequenzunterschiede an den anderen Po-

sitionen sind konservative Mutationen, d.h., eine basische, aliphatische etc. Aminosäure wurde gegen eine andere gleicher biochemischen Eigenschaften ausgetauscht. Die Region zwischen Aminosäure 110–155 weist eine im Vergleich zum Restprotein besonders hohe Homologie (75%) auf und es gibt Hinweise, daß in diesem Bereich die Rezeptorbindungsstelle lokalisiert ist. Da die dreidimensionale Struktur des IFN bislang jedoch nicht erarbeitet wurde, sind solche Funktionszuweisungen einzelner Sequenzabschnitte noch hypothetisch. Alle IFN- α haben Cysteine an homologen Positionen (1, 29, 99, 139), wobei Disulfidbrücken zwischen Aminosäuren 29–139 und Aminosäuren 1–99 vorliegen. Die Bindung 29–139 ist essentiell für die biologische Aktivität des IFN- α , während Cys 1 und 99 durch gezielte Mutagenese entfernt werden konnten, ohne daß ein Aktivitätsverlust im antiviralen Assay auftrat. Das Molekulargewicht der IFN- α beträgt ca. 18–19 kd. Es gibt Hinweise, daß einige Subtypen als Glykoproteine vorliegen, die Mehrzahl der IFN hat jedoch keine Kohlehydratseitenketten.

Wie erwähnt, wurden bislang ca. 15 funktionelle IFN- α -Gene identifiziert. Es ist jedoch nicht nachgewiesen, daß alle Gene auch expremiert werden bzw. es gibt konkrete Befunde, daß in den bislang analysierten Zellsystemen einige Subtypen (α 1, α 2, α 4) weit stärker vertreten sind als andere. Hieraus ergibt sich die Frage nach der biologischen Bedeutung dieser Vielzahl von IFN- α -Subtypen. Ein Vergleich des Aktivitätsspektrums reiner IFN- α -Subtypen ergab, daß prinzipiell alle IFN- α in den drei Assaysystemen (antiviral, antiproliferativ, Aktivierung von „natural killer“ (NK)-Zellen) eine Aktivität aufwiesen. Sie unterschieden sich jedoch in den relativen Aktivitäten, d.h., einige waren stärker antiviral aber weniger antiproliferativ etc. Es ist später ein Subtyp beschrieben worden, der praktisch keine Aktivität im NK-Assay aufweist [63]. Diese relativen Unterschiede scheinen jedoch insgesamt zu wenig ausgeprägt, um auf eine unterschiedliche biologische Funktion hinzuweisen. Möglicherweise ist unser Verständnis der biologischen Aktivitäten von Interferon in dieser Hinsicht noch zu beschränkt und andere Fragestellungen könnten signifikantere Unterschiede der relativen Aktivitäten aufweisen. Die Frage nach der Bedeutung der verschiedenen IFN- α wird noch dadurch interessanter, daß auch in anderen Spezies (Maus, Ratte, Rind) eine Multigenfamilie gefunden wurde, molekular-phylogenetische Analysen aber darauf schließen lassen, daß diese Gen-Multiplikationen in Maus und Mensch unabhängig voneinander erfolgt sind. Die Entwicklung verschiedener Subtypen könnte daher ein wichtiger Faktor für die physiologische Bedeutung des IFN- α sein.

Im Gegensatz zu IFN- β und IFN- γ ist humanes IFN- α nur eingeschränkt artspezifisch, erhebliche antivirale Aktivität wird auch auf Maus- und Rindzellen gefunden. Für den Subtyp IFN- α_2 wurden kürzlich 3 Aminosäurereste identifiziert, deren experimentelle Veränderung durch gerichtete Mutagenese zu einer mehr als hundertfachen Zunahme der antiviralen Aktivität auf Mauszellen führte [87]. Interessanterweise liegen diese Aminosäuren in dem Bereich, der als mögliche Rezeptorbindungsstelle beschrieben wurde. Hieraus ist zu folgern, daß die Artspezifität der Interferone allein auf die sterische

Spezifität der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zurückzuführen ist, die Mechanismen der intrazellulären Aktivität in den verschiedenen Spezies jedoch identisch sind.

Interferon- β

Zur Klasse des IFN- β gehört nach gegenwärtigem Kenntnisstand ein Protein und das korrespondierende Gen. Mehrfach beschriebene weitere IFN- β beim Menschen bzw. der Maus sind in keinem Fall biochemisch und molekularbiologisch eindeutig charakterisiert worden, lediglich beim Rind wurden drei verschiedene IFN- β -Gene nachgewiesen. Ein kürzlich beschriebenes IFN- β_2 , dessen Verwandtschaft zum klassischen IFN- β jedoch fragwürdig ist, wird am Ende dieses Abschnitts kurz diskutiert werden.

Die sezernierte Form des IFN- β ist ein Protein bestehend aus 166 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht hieraus wäre ca. 20 kd, daß wirkliche Molekulargewicht des natürlichen IFN- β liegt jedoch bei ca. 25 kd, da das Protein durch Glykosylierung modifiziert wird. Sequenz- und Zuckeranalysen weisen auf eine N-glykosidische Modifikation hin, wobei die wahrscheinlichste Anheftungsstelle dieser Seitenkette an Position 80 der Aminosäuresequenz liegt (Asn80-Glu81Thr82). Diese Zuckerseitenketten sind nicht notwendig für die biologische Aktivität des Proteins *in vitro*, da ihre enzymatische Entfernung bzw. ihre primäre Abwesenheit in rekombinanten IFN- β aus *E. coli* nicht zu einem Aktivitätsverlust führen. IFN- β hat 3 Cysteinreste (Position 17, 31, 141) mit einer essentiellen Disulfidbrücke zwischen Position 31–141. Disulfidbrücken zwischen Cystein 17 und einem der anderen Cysteine führen zu inaktivem IFN- β . Aus diesem Grunde ist in manchen rekombinanten IFN- β das Cystein 17 durch ein Serin ersetzt worden, ohne daß sich Änderungen in der biologischen Aktivität ergeben haben [57]. IFN- β wirkt ausschließlich auf Primatenzellen, wie es die klassische IFN-Definition fordert.

Sequenzvergleiche von IFN- β und IFN- α belegen ein signifikantes Maß an Homologie; an ca. 30% der Positionen der Proteinprimärsequenz sind identische Aminosäurereste. Diese hohe Homologie legt nahe, daß IFN- β und IFN- α phylogenetisch aus einem gemeinsamen Urgen entstanden sind. Die beiden IFN-Klassen weisen weitere prinzipielle Gemeinsamkeiten auf. Ihre Gene sind gekoppelt in einem Gencluster auf Chromosom 9 (Chromosom 4 bei der Maus) lokalisiert. Direkte DNA-Analysen von klonierten, überlappenden Chromosomabschnitten, Segregationsanalysen an somatischen Zellhybriden und RFLP-Analyse (RFLP = restriction fragment length polymorphism) belegen eine enge Nachbarschaft dieser Gene auf dem Chromosom [62]. Weder das IFN- β -Gen noch die IFN- α -Gene enthalten Introns, was für Eukaryontengene ungewöhnlich ist und die Vorstellung eines gemeinsamen Urgens erhärtet. IFN- β und IFN- α weisen auch in ihren biologischen Eigenschaften eine hohe Ähnlichkeit auf. Sie binden an den gleichen Zellrezeptor mit ähnlicher Affinität und haben ein identisches Aktivitätsspektrum. Die

oben gestellte Frage nach der biologischen Bedeutung der verschiedenen IFN- α Subtypen läßt sich hier für IFN- α und IFN- β wiederholen.

In den letzten Jahren ist ein weiteres Protein isoliert und molekularbiologisch charakterisiert worden, welches u. a. auch als IFN- β_2 bezeichnet wurde [90]. Diese Bezeichnung rührt daher, daß das Protein in einigen Zellkulturen mit IFN- β coinduziert wird und nach Ergebnissen einiger Arbeitsgruppen eine antivirale Aktivität besitzt, die durch ein Antiserum gegen klassisches IFN- β von Fibroblasten neutralisierbar ist. Diese Befunde werden aber z. Z. noch kontrovers diskutiert. Sequenzanalysen des IFN- β_2 lassen keine Homologie zu IFN- β oder IFN- α erkennen, so daß eine phylogenetische Verwandtschaft zu diesen Interferonen nicht besteht. Die funktionelle Verwandtschaft muß noch bestätigt werden. Neben der diskutierten antiviralen Aktivität wird dem IFN- β_2 eine antiproliferative Aktivität zugesprochen, die es mit klassischen Interferonen teilen würde. Die primäre Aktivität dieser Substanz scheint jedoch eine Stimulation der B-Zellaktivierung/Differenzierung und eine Hepatozyten-stimulierende Aktivität zu sein [31, 92]. Dementsprechend ist es in der Literatur auch als B-cell stimulating factor-2 (BSF-2), hybridomaplasmocytoma-growth-factor (HPGF) und als hepatozyte-stimulating-factor (HSF) beschrieben worden. Als Konsensus wurde Interleukin 6 (IL 6) eingeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2. Eigenschaften von Interferon- β_2 /Interleukin 6

Name:	IFN- β_2 /IL 6/BSF-2/HPGF/HSF/26kd protein
Struktur:	222 Aminosäuren 23-27 kd Molekulargewicht, abhängig von Glycosilierung
Gen:	organisiert in Introns/Exons lokalisiert auf Chromosom 7 keine Sequenzhomologie zu anderen Interferonen
Rezeptor:	nicht identisch mit IFN- β - oder IFN- α -Rezeptor, keine Konkurrenz mit Interferonen
Induzenten:	TNF, IL 1, PDGF, IFN- β_1 , Virus, dsRNA, Cycloheximid
Produzentenzellen:	Fibroblasten, Epithelzellen, Hepatocyten, T-Zellen, Monocyten, Makrophagen
Aktivitäten:	a) z. Z. akzeptiert <ul style="list-style-type: none"> - Wachstums-/Differenzierungsfaktor für B-Zellen - Wachstumsfaktor für Knochenmarkzellen - Stimulierung von Hepatocyten (Mediator der „acute-phase protein response“) b) z. Z. kontrovers <ul style="list-style-type: none"> - antiviral - Induction der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase - antiproliferation auf Fibroblasten

Interferon- γ [86]

Auch die dritte Interferonklasse wird durch nur ein Protein und ein Gen dargestellt. Das native IFN- γ ist ein Protein von ca. 45 kd, welches sich unter denaturierenden Bedingungen in zwei Untereinheiten von ca. 20 kd und 25 kd auflösen läßt. Protein- und DNA-Daten belegen eindeutig, daß diese zwei Untereinheiten eine identische Aminosäuresequenz besitzen. Unterschiede im Molekulargewicht oder Untereinheiten entstehen durch Glycosilierung, wobei zwei potentielle Positionen für eine N-glycosidische Modifizierung aus der Aminosäuresequenz ableitbar sind (Asn 28 und Asn 100). Die 20 kd-Untereinheit ist an Position 28 glykosiliert, während die 25 kd-Untereinheit an beiden Positionen Seitenketten trägt. Die sezernierten Untereinheiten bestehen primär aus 143 Aminosäureresten. Sekundär kann der C-Terminus des Proteins um einige Aminosäuren verkürzt werden, ohne daß sich die biologische Aktivität vermindert. Ähnliches ist für IFN- α beschrieben worden, welches physiologisch mehrfach als ein um 10 Aminosäuren am C-terminus verkürztes Protein isoliert wurde. Das IFN- γ hat zwei Cysteine, bildet jedoch keine Disulfidbrücke aus.

Interferon- γ ist nach einer Reihe von Kriterien eindeutig von IFN- α und IFN- β abzugrenzen. Die Proteinsequenz weist keinerlei Homologie zu den anderen Interferonen auf, d.h., IFN- γ hat sich phylogenetisch unabhängig von der IFN- α/β -Gruppe entwickelt. Das Gen des IFN- γ ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Abweichend von IFN- α/β weist es die für eukaryontische Gene typische Organisation in Introns und Exons auf. Physikochemisch unterscheidet sich IFN- γ durch seine Säurelabilität und eine größere Empfindlichkeit gegenüber Hitzebehandlung und Detergentien von IFN- α/β . Jedoch auch hinsichtlich seiner Biologie ist IFN- γ abgrenzbar. Es bindet an einen anderen Zelloberflächenrezeptor, hat ein teilweise abweichendes Aktivitätsspektrum (z.B. Induktion von MHC-class 2 Antigenen) und wird wahrscheinlich ausschließlich von einem Zelltyp (T-Lymphozyten) gebildet. Historisch wird IFN- γ als Interferon-TypII von den anderen, als Interferon-TypI bezeichneten Klassen abgegrenzt.

Interferoninduktion und Induzenten

Wenn Interferone ausschließlich antivirale Eigenschaften hätten, so wäre im Prinzip ihre dauernde Bildung im Organismus wünschenswert, um das allgegenwärtige Risiko einer Virusinfektion zu vermindern. Interferone haben jedoch eine Vielzahl von Wirkungen auf Zellmetabolismus, Wachstum und Differenzierung; und ihre dauernde Anwesenheit (in für uns nachweisbaren Mengen!) erscheint daher für den Organismus unerwünscht. Dementsprechend sind alle Interferone induzierbare Proteine, die auf Genaktivierung durch spezifische Induzenten hin gebildet werden. Der gesunde Organismus bildet kein nachweisbares Interferon bzw. der Nachweis von Interferonen in der Zirkulation deutet auf einen pathologischen Zustand hin. Dies soll nicht

im Gegensatz zu einigen neueren Hinweisen stehen, daß im Rahmen einer physiologischen Wachstumskontrolle eine autokrine Interferonproduktion eine wichtige Regulationsfunktion ausübt oder das Makrophagen des Peritoneums auch in Abwesenheit von Virus Interferon sezernieren [4, 66]. Auch diese quantitativ geringe, auch „physiologisch“ genannte Interferonproduktion erfolgt wahrscheinlich nicht konstitutiv, sondern auf Induktion hin, wobei im letzteren Fall das normalerweise allgegenwärtige bakterielle LPS die Rolle eines solchen „Dauerinduzenten“ ausüben könnte.

Virale Interferoninduzenten [75]

Unter der Annahme, daß Interferone endogene antivirale Substanzen sind, sollten Viren selbst potente Interferoninduzenten sein. Dies gilt in der Tat für viele Viren der verschiedensten Gruppen. Die Stärke dieser Interferonproduktion variiert stark in Abhängigkeit von Virus- und Zellsystem; es scheint jedoch eine Extrapolation vorliegender Daten dahingehend gerechtfertigt zu sein, daß im geeigneten Zellsystem alle Viren Interferoninduzenten sein können. Es ist daher umso überraschender, daß die virale Struktur, welche als Induzent wirkt, noch immer nicht eindeutig beschrieben werden konnte. Es gibt jedoch einen starken Kandidaten, welcher in einer Vielzahl von Fällen diese Rolle ausüben könnte: doppelsträngige RNA (dsRNA). Diese Substanz ist im Organismus wie in der Zellkultur als Induzent von IFN- α und IFN- β nachgewiesen worden, wobei die Herkunft der dsRNA für deren Induktionspotential unerheblich ist. Induzenten sind die genomische dsRNA animaler Viren (z. B. Reovirus), dsRNA-Plasmide aus Hefen oder synthetische RNA, deren gebräuchlichste Form in der Interferonforschung das polyI: polyC ist, ein Doppelstrang bestehend aus je einem homopolymeren poly-Cytidyl- und einem poly-Inosylsäure-Strang. Bedeutsam für die Interferoninduktion ist die Länge (50 bp) und Stabilität der dsRNA. Doppelsträngige DNA bzw. DNA:RNA Heteroduplexe haben keine Aktivität. Vermutete in-vivo-Induzenten sind die dsRNA-Intermediate, die im Replikationszyklus einzelsträngiger RNA-Viren auftreten. Hinweise für diese Annahme ergeben sich aus Versuchen mit inaktivierten RNA-Viren bzw. ts (= temperature-sensitive)-Mutanten, z. B., NewCastle Disease Virus, Sindbisvirus, Reovirus oder „defective interfering particles“ (DI) des VSV. Letztere liegen im Gegensatz zum Wildtyp-VSV als partiell dsRNA im Genom vor und sind durchweg bessere Interferoninduzenten als der einzelsträngige Wildtyp. Insgesamt ist die Korrelation von Interferoninduktion und dem Vorliegen von dsRNA aber bei weitem nicht perfekt und die Beteiligung anderer Viruskomponenten z. B. viraler Proteine an der Induktion erscheint wahrscheinlich. Völlig offen ist die Frage der Interferoninduktion durch DNA-Viren wie z. B. Herpesviren, Poxvirus, Papovaviren. Auch hier wird die Bildung von dsRNA durch symmetrische Transkription von beiden DNA-Strängen postuliert, jedoch sind solche Produkte bisher nicht eindeutig nachgewiesen. Im Falle des Adenovirus Typ 12 wurde kürzlich gezeigt, daß die Expression des viralen E1B Gens in primä-

ren menschlichen Zellkulturen das IFN- β -Gen aktiviert. Umgekehrt wurde im Falle des Hepatitis B-Virus gezeigt, daß ein definiertes virales Gen, welches für das ‚core‘-Antigen kodiert, die Induzierbarkeit des IFN- β -Gens durch dsRNA herabsetzt.

Nicht-virale-Induzenten [75]

Der Begriff „nicht-viral“ deutet bereits an, daß die Mehrzahl der verbleibenden Induzenten nicht positiv zu klassifizieren ist. Von physiologischer Bedeutung ist möglicherweise die Induktion von Interferon in Leukozyten durch bakterielle Lipopolysaccharide, da sie zu einer ständigen Interferonproduktion im Organismus führen könnte. Synthetische Induzenten außer den dsRNAs sind das Tiloron und einigen Acridinderivate. Die Induktion des IFN- γ erfolgt im Rahmen einer Aktivierung der T-Lymphozyten, die klon-spezifisch durch das entsprechende Antigen und unspezifisch durch T-Zell-mitogene wie Phytohämagglutinin oder Concanavalin A erfolgen kann.

Mechanismen der Interferonfunktion [12]

Die Regulation der Genexpression, für welche die Interferoninduktion nur ein Einzelbeispiel ist, kann prinzipiell auf verschiedenen Ebenen erfolgen; deren wesentlichsten sind:

- a) Transkriptionsaktivität des Gens,
- b) Stabilität der mRNA,
- c) Translationskontrolle oder
- d) die Modifikation und Sekretion des „de novo“ synthetisierten oder präexistierenden Proteins.

Für die Interferonexpression scheinen die zwei ersteren die entscheidenden Regulationsebenen zu sein. Im nicht-induzierten Zustand ist keine Transkriptionsaktivität der Interferongene nachweisbar. Innerhalb eines variablen, aber relativ kurzen Zeitraums nach Induktion steigt die Transkriptionsaktivität an und die IFN mRNA akkumuliert im Zytoplasma. Die Höhe und Dauer der mRNA Akkumulation korreliert mit der extrazellulär meßbaren IFN-Produktion, so daß translationelle und posttranslationelle Regulation von geringer Bedeutung zu sein scheinen. Wie die Wechselwirkung von Induzent und Zelle in Genaktivierung umgesetzt wird ist nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, daß der Induzent in die Zelle aufgenommen wird und hier das Signal für die Expression der Interferongene erzeugt. Welches Interferon induziert wird, hängt sowohl vom Induzenten wie vom Zelltyp ab. Klassische Induzenten der experimentellen Interferonforschung sind die Paramyxoviren Newcastle Disease Virus (NDV) und Sendai Virus sowie die synthetische dsRNA polyI:polyC. Induziert man Kulturen von Namalva Zellen (eine humane, lymphoblastoide Linie) mit NDV, erhält man ein Gemisch aus ca. 85% IFN- α und 15%

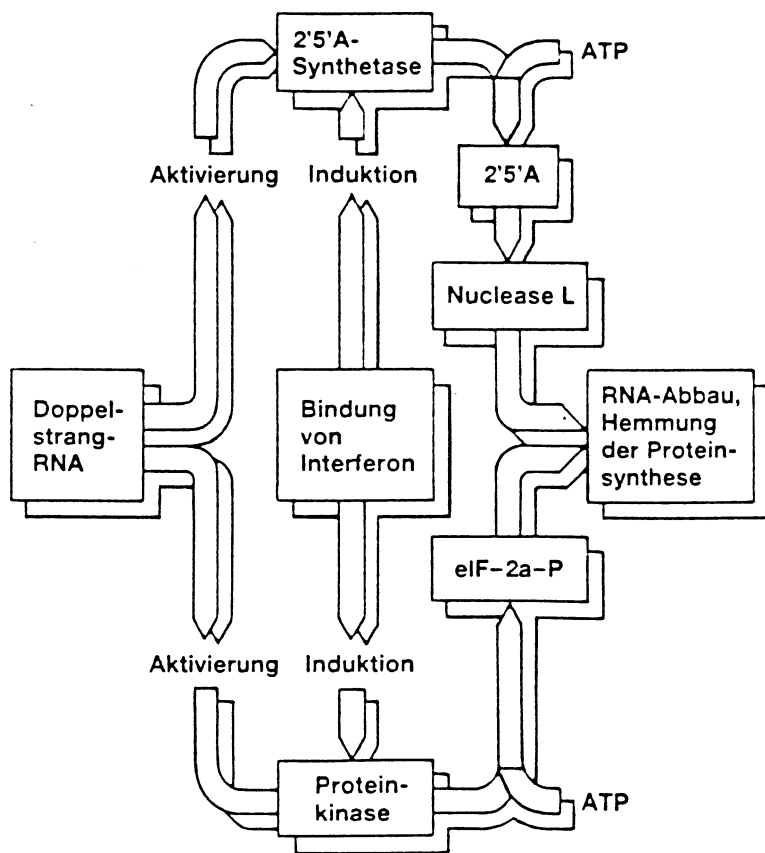


Abb. 1. IFN-induzierte Regulationsmechanismen der Proteinbiosynthese

IFN- β ; behandelt man Fibroblastenkulturen mit dem gleichen Induzenten, so ist der Anteil an IFN- β erheblich höher. Werden Fibroblastenkulturen mit dsRNA induziert, so wird ausschließlich IFN- β synthetisiert. In vielen Fällen werden IFN- α und IFN- β ko-induziert, was auf einen ähnlichen Induktionsmechanismus hinweist. Diese Hypothese ist durch molekularbiologische Analyse der Interferoninduktion bestätigt worden. Sequenzbestimmungen an genomischen Klonen verschiedener IFN- α -Gene und des IFN- β -Gens haben gezeigt, daß die Sequenzhomologien zwischen IFN- α und IFN- β nicht auf die kodierenden Genbereiche beschränkt sind, sondern sich auch auf die 5'-Promotorregionen erstrecken. Diese Promotorregionen enthalten die regulatorischen Elemente der Interferongene, d. h., jene DNA-Bereiche, die in spezifischer Wechselwirkung mit Aktivator- und Repressorproteinen der Genaktivität stehen. Sequenzhomologien in diesem Bereich deuten auf verwandte Regulationsmechanismen hin. Die regulatorischen Promotorbereiche des IFN- β -Gens sind detailliert analysiert worden. Die hierzu angewandten

experimentellen Strategien sind u. a. die Isolierung des Promotorbereichs und anschließende Modifizierung der Sequenz durch Deletion bestimmter Bereiche, Insertion einer „zufälligen“ Fremd-DNA und der gezielte Austausch einzelner Basen durch in-vitro-Mutagenese. Derartig modifizierte Promotor-Gen-Konstrukte werden dann in Zellen zurückgeführt und ihre Aktivität anhand der IFN-Produktion oder der mRNA-Menge bestimmt. Diese Arbeiten haben einen Bereich von ca. 110 Basenpaaren im Promotor der IFN- α/β -Gene identifiziert, welcher für die geregelte Expression des Interferongens essentiell ist. Wird dieser Sequenzabschnitt in den 5'-Bereich eines Fremdgens insertiert, z. B. des Globins, so wird dieses Gen wie ein Interferongen expremiert, d. h. es wird durch Virus oder dsRNA induzierbar. Feinanalysen haben innerhalb dieses Sequenzabschnittes Subregionen identifiziert, die für positive oder negative Kontrolle notwendig sind [32, 50]. In einem einfachen, experimentell schon teilweise belegten Modell geht man davon aus, daß im negativen Kontrollbereich der nicht-induzierten Zelle ein Repressorprotein bindet, welches das Gen für den die RNA-Polymerase enthaltenden Transkriptionskomplex blockiert. Nach Induktion binden Aktivatorproteine an die positiven Kontrollbereiche, lösen den Repressor und öffnen dem Transkriptionskomplex den Weg zum Strukturgen. Diese Aktivatorproteine müßten direkt oder indirekt mit dem Induzenten wechselwirken, um als Boten der Induktion zu fungieren.

Die Stärke der Interferoninduktion läßt sich positiv modulieren durch das „priming“ und die Superinduktion. Unter „priming“ versteht man Vorbehandlung der Zellkultur mit geringen Mengen von Interferon vor der eigentlichen Induktion mit z. B. Virus. Dieses „priming“ führt zu einer erheblichen Steigerung der IFN-Produktion. Die mechanistische Grundlage ist bislang nicht aufgeklärt, die biologische Bedeutung ist jedoch einleuchtend. Eine Virus-infizierte Zelle wird häufig Interferon sezernieren, bevor Virus freigesetzt wird. Für benachbarte Zellen hieße dies, daß sie durch dieses IFN ein „priming“ erfahren und bei nachfolgender Infektion verstärkt IFN bilden; Interferon wirkt hier als ein „Autokatalysator“.

Die normale Interferoninduktion ist selbstbegrenzend, auch bei ständiger Gegenwart des Induzenten ist die Genaktivität nur transient erhöht. Führt man jedoch die IFN-Induktion in Gegenwart eines Inhibitors der Proteinsynthese durch (z. B. Cycloheximid), so wird die Genexpression verstärkt und verlängert und erheblich größere Mengen an IFN-mRNA akkumulieren in dem Zytoplasma. Diese RNA wird nach Entfernen des Inhibitors in eine entsprechend größere Menge Protein translatiert. Diese „Superinduktion“ hat wahrscheinlich zwei mechanistische Grundlagen; einerseits wird die Stabilität der mRNA erhöht, andererseits wird die Transkriptionsaktivität des Gens verstärkt [20]. Beide Effekte lassen sich damit erklären, daß bei Hemmung der Proteinbiosynthese zwei kurzlebige Repressoren der Interferonexpression entfernt werden, im ersteren Fall eine nukleolytische Aktivität, im zweiten ein Repressor der Interferongentranskription. Sowohl „priming“ wie auch Superinduktion werden bei der Produktion von natürlichem Interferon aus Zellkulturen angewandt.

Interferonproduktion

In diesem Abschnitt müßten zwei Themenkomplexe diskutiert werden;

- a) die natürliche Interferonproduktion im Organismus, insbesondere im Verlauf viraler und bakterieller Infektionen und
- b) die Interferonproduktion in Zellkulturen, deren wesentlicher Zweck die Herstellung von Interferon für Klinik und Forschung ist.

Ich möchte mich hier im wesentlichen auf den zweiten Aspekt beschränken und werde auf ersteren Gesichtspunkt im Rahmen der antiviralen und anti-proliferativen Aktivität zurückkommen.

Zu der Interferonproduktion *in vivo* liegen eine Vielzahl Untersuchungen vor, in denen Interferon in den verschiedensten Kompartimenten des Organismus nach Induktion mit natürlichen oder synthetischen Induzenten nachgewiesen wurde. Wie zu erwarten, sind im Verlaufe vieler viraler Infektionen Interferone nachweisbar, wobei Stärke und Lokalisierung der Interferonantwort nur teilweise mit Ort und Ausmaß der Virusinfektion korreliert sind. Die relevante Frage nach den natürlichen Produzentenzellen *in vivo* ist jedoch noch weitgehend unbeantwortet und wird wohl auch für verschiedene Virustypen unterschiedlich beantwortet werden müssen. Eine Zusammenstellung aller Arbeiten zur Interferonproduktion im Organismus findet sich bei W. E. Stewart. Neuere Untersuchungen zu diesem Thema liegen kaum vor, obwohl sie zu unserem Verständnis der physiologischen Bedeutung des Interferonsystems erheblich beitragen könnten.

Ich möchte mich jetzt der „technischen“ Herstellung von Interferon in Zellkulturen bzw. Mikroorganismen zuwenden. Das hier gewonnene Interferon läßt sich prinzipiell in natürliches Interferon und rekombinantes Interferon einteilen – natürlich, wenn das Interferon das Produkt eines unmodifizierten Gens ist, wie es normalerweise im Genom vorliegt, rekombinant, wenn das Gen bzw. eine Kopie des Gens isoliert und nachfolgend in einer heterologen Zelle, zumeist in *E. coli*, exprimiert wurde. Natürliches und rekombinantes Interferon können Unterschiede aufweisen, die weiter unten diskutiert werden.

Zur Produktion von natürlichem Interferon werden solche Zellen verwendet, die in großen Mengen kultivierbar und gute IFN-Produzenten sind. Drei Kultursysteme werden im wesentlichen benutzt:

1. Leukozyten aus Spenderblut
2. die Namalva-Zelle, eine von einem Burkitt-Lymphom abgeleitete lymphoblastoide Linie und
3. diploide Fibroblastenkulturen.

Leukozyteninterferon (LeIFN- α)

Das Verfahren zur Herstellung von Leukozyteninterferon wurde entwickelt von K. Kantell. Historisch war es das erste Interferonpräparat, welches in klinischen Versuchen eingesetzt wurde. Bei diesem Verfahren werden Leuko-

zyten aus Spenderblut isoliert und in Kultur genommen. Die Interferoninduktion erfolgt durch Infektion mit Sendavirus (Paramyxovirus) nach vorhergehendem „priming“ mit exogenem Interferon. Dieses Induktionsprotokoll ist nicht spezifisch für einen Typ des IFN- α , sondern induziert eine Gruppe von IFN- α . Leukozyteninterferon ist somit ein Mischpräparat von letztlich unbestimmter Zusammensetzung aus verschiedenen IFN- α -Subtypen, welches u. U. zusätzlich zu den Interferonen noch weitere Lymphokine und Monokine enthält. Es ist vorstellbar, daß diese „biologische“ Vielfalt des Leukozyteninterferon bei manchen Anwendungen dessen Wirksamkeit im Vergleich zu IFN- α -Monopräparaten, wie sie über gentechnische Produktionstechniken erzeugt werden, erhöht, obwohl eindeutige Beweise hierfür noch erbracht werden müssen.

Lymphoblastoides Interferon (LyIFN- α)

Zur Produktion werden Namalva-Zellkulturen eingesetzt, die mit Sendavirus oder NDV induziert werden. Auch hier erhält man eine Anzahl von IFN- α -Subtypen ähnlich dem Leukozytenpräparat plus einem variablen Anteil an IFN- β . LyIFN- α ist daher wie Leukozyteninterferon ein Mischpräparat von nur teilweise definierter Zusammensetzung.

Natürliches IFN- β

Zur Produktion von natürlichem IFN- β werden Fibroblastenkulturen eingesetzt. Die Induktion erfolgt mit dsRNA nach dem Superinduktionsprotokoll. Bei diesem Verfahren wird in Fibroblasten ausschließlich IFN- β induziert, d. h., hinsichtlich des Interferonanteils ist Fibroblasteninterferon ein Monopräparat. Hinsichtlich anderer Kontaminationen mit aktiven Substanzen müssen ähnliche Einschränkungen wie bei den anderen natürlichen Interferonen gemacht werden.

Rekombinante Interferone

Als Alternative zu Gewinnung von Interferonen aus ihren natürlichen Produzentenzellen wird heute weitgehend rekombinantes Interferon aus gentechnisch modifizierten Mikroorganismen oder Zelllinien für die klinische Forschung hergestellt. Das Prinzip dieser Methode ist die Isolierung oder „de novo“ Synthese der DNA-Sequenz, die für das gewünschte Protein kodiert und ihr Einbau in das Genom eines Fremdorganismus, z. B. des Bakteriums *E. coli*, der Hefe *Saccharomyces* oder in Säugerzellen wie der CHO-Linie (Chinese hamster ovary). Vorteile der gentechnischen Herstellung sind:

- a) Mikroorganismen sind leichter zu manipulieren und kultivieren als Säugerzellen,

- b) das Gen wird seiner natürlichen, im Falle der Interferone sehr stringenten Kontrolle entzogen und unter die Kontrolle eines expressionsaktiven bakteriellen oder viralen Promotors gesetzt und
- c) man kann das Gen und somit die Struktur des Proteins gezielt verändern.

Über gängige Verfahren sind inzwischen IFN- β , IFN- γ und mehrere Subtypen des IFN- α kloniert und produziert worden. Natürliche und rekombinante Interferone haben zumeist eine identische Primärstruktur (= Aminosäuresequenz). Einige sekundäre Unterschiede und ihre potentiellen Konsequenzen sollen kurz diskutiert werden. Natürliches IFN- β und IFN- γ und möglicherweise Subtypen des IFN- α werden als Glykoproteine sezerniert. Diese Modifikation wird von Bakterienzellen nicht durchgeführt und das so produzierte Interferon ist daher nicht glykosyliert. Es gibt bislang keinen Hinweis, daß hierdurch das biologische Aktivitätsspektrum des Proteins modifiziert wird, es sind jedoch Unterschiede in der biologischen Stabilität, der Pharmakokinetik und Antigenität denkbar. Als Alternative zur Expression in Bakterien können klonierte Gene unter der Kontrolle eines Fremdpromotors in Zelllinien exprimiert werden, im Falle der humanen Interferone z.B. in den heterologen CHO-Zellen. In diesem System werden alle Modifikationen durchgeführt und das rekombinante Produkt ist mit dem natürlichen Interferon identisch.

Natürliches Interferon wird – wie alle Glykoproteine – in der „precursor“-Form mit N-terminalem Signalpeptid synthetisiert. Dieses Signalpeptid wird während des Sekretionsprozesses proteolytisch abgespalten. Rekombinante, in Bakterien exprimierte Gene, enthalten diese Signalsequenz nicht und das Protein akkumuliert als partiell denaturiertes Produkt in intrazellulären Granula [64]. Neben der Reinigung muß eine Renaturierung durchgeführt werden, um biologisch aktives Protein zu erhalten. Wenn die Effizienz dieses Schrittes nicht 100% ist, kann das Endpräparat u. U. noch denaturiertes Protein enthalten. Hierdurch bedingte antigene Eigenschaften könnten während einer längerfristigen Therapie zur Antikörperbildung führen.

Eines der besonderen Probleme bei der Produktion in *E. coli* ist neben der Renaturierung die Ausbildung der Disulfidbrücken in der korrekten, nativen Konfiguration, wenn mehrere Isomere möglich sind. Im Falle eines rekombinanten IFN- β hat man dieses Problem umgangen, indem man ein nicht-essentiell Cystein (Cys17) durch Mutagenese in ein Serin umwandelte, so daß die zwei verbleibenden Cysteine nur noch die native Disulfidbrücke ausbilden können.

Anschließend sei für den Fall des IFN- α noch einmal darauf hingewiesen, daß rekombinantes IFN- α im Gegensatz zur natürlichen Situation ein Monopräparat ist, im allgemeinen der Subtyp α_2 . Dieser Subtyp weist in Zellkulturen alle Aktivitäten auf, die für z.B. Le IFN- α berichtet wurden. Ob hieraus allerdings eine 100%-Übereinstimmung der Aktivitäten für die wesentlich komplexere Situation im Organismus folgt, kann beim gegenwärtig limitierten Kenntnisstand dieser Aktivitäten nur angenommen werden.

Zum Abschluß dieses Abschnitts zur Biochemie der Interferone möchte ich noch eine kurze Darstellung zu ihrer spezifischen Aktivität geben. Die bio-

logische Aktivität wird gängigerweise in einem Virus-Reduktionsassay bestimmt und dabei in Vergleich zu einem Standardpräparat von bekannter Aktivität gesetzt. Die Aktivitätsangabe erfolgt in IU (IU = international unit), wobei eine Einheit die Interferonaktivität ist, die eine 50%-Reduktion der Virusausbeute bewirkt. Die spezifische Aktivität von natürlichem reinen IFN- α und IFN- β in diesem Assay beträgt ca. 10^8 IU pro mg Protein. Bei einem angenäherten Molekulargewicht von 20000 dalton entspricht somit eine Aktivität von 1 IU pro Milliliter einer Interferonkonzentration von 2.5×10^{-13} M bzw. 5×10^{-12} g (entsprechend 5 pg) pro Milliliter [67].

Die biologischen Aktivitäten von Interferon

Interferon in der ursprünglichen Definition war ein endogenes antivirales Protein. Diese Definition muß heute in zwei Richtungen erweitert werden:

- a) Es gibt nicht ein Interferon, sondern z.Z. drei Interferonklassen mit mindestens 15–20 Einzeltypen, und
- b) Interferone sind auch antiviral, haben aber eine Vielzahl anderer Aktivitäten.

Das Aktivitätsspektrum der Interferone läßt sich in drei Aktivitätsgruppen einteilen (Abb. 2):

1. Die antivirale Aktivität
2. Die antiproliferative Aktivität
3. Die immunregulatorische Aktivität

von denen die ersten zwei hier besprochen werden. Diese Einteilung erfolgt primär aus Gründen der Darstellung, sie soll nicht beinhalten, daß es sich um mechanistisch gänzlich abgrenzbare Aktivitätskomplexe handelt. Insbesondere hinsichtlich der antiviralen und antiproliferativen Aktivität gibt es deutliche Hinweise auf überlappende Mechanismen. Bei den komplexeren Aktivitäten, wie der antitumoralen Wirkung der Interferone im Organismus, muß mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß diese eine Funktion mehrerer Basisaktivitäten sind. Auch die antivirale Wirkung im Organismus hat neben der intrazellulären antiviralen Aktivität, deren Ziel das replizierende Virus ist, eine immunologische Komponente, deren Ziel die Virus-infizierte Zelle ist. Unsere Vorstellung von der physiologischen Rolle der Interferone ist durch neue Befunde erweitert worden, die eine „spontane“ Interferonproduktion in proliferierenden Zellkulturen nachweisen und Interferone in den Rahmen einer endogenen Wachstumskontrolle rücken.

Voraussetzungen der biologischen Aktivitäten

In ihrer prinzipiellen Wirkungsweise weisen die Interferone weitgehende Parallelen mit Peptidhormonen und Wachstumsfaktoren auf. Ihre primäre Wechselwirkung mit der Zelle ist die Bindung an einen spezifischen Rezeptor

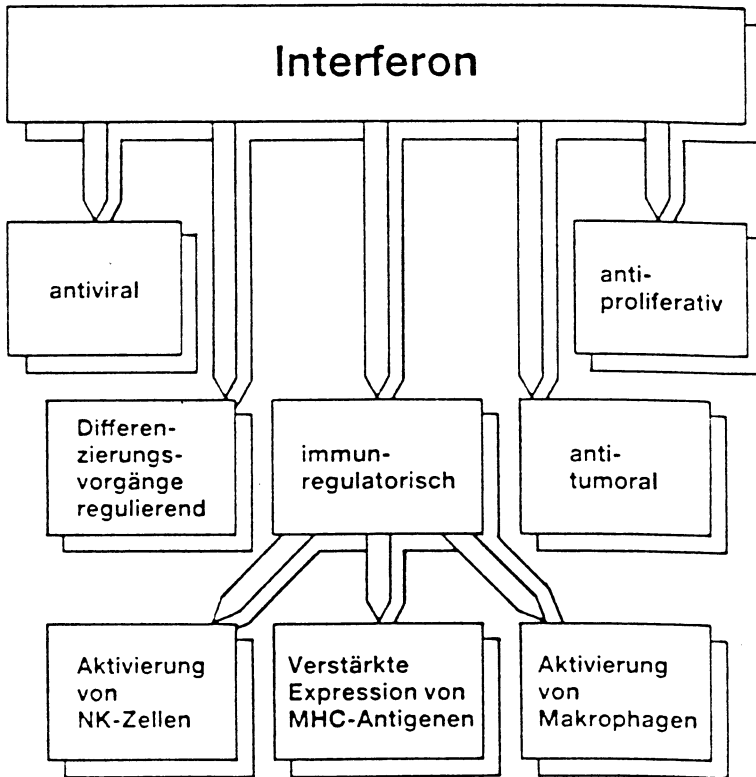


Abb. 2. Das biologische Wirkungsspektrum der Interferone

auf der Zelloberfläche [93]. Diese Bindung löst eine Signalübermittlung zum Zellkern aus und bewirkt die Aktivierung einer Gruppe von Genen [28, 69]. Die „de novo“ Synthese der entsprechenden Proteine führt zu den Veränderungen im Phänotyp der Zelle, die mit o. g. Aktivitäten verbunden sind. Die Wirkung der Interferone erfordert also eine aktive RNA- und Proteinsynthese. Die Aktivierung spezifischer Gene läßt sich bereits wenige Minuten nach Bindung des Interferons an den Rezeptor nachweisen. Nach ca. 1 h akkumulieren die entsprechenden Transkripte im Zytoplasma und werden translatiert. Die Mechanismen dieser spezifischen Genaktivierung durch Interferon beruhen sowohl auf einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene als auch auf einer vermehrten Stabilität der induzierten mRNA. Die Genaktivierung ist transient und fällt auch in ständiger Gegenwart von Interferon wieder ab. Wieviele Gene durch Interferon direkt aktiviert werden ist noch unbekannt, die Tabelle 3 gibt einen ungefähren Überblick. IFN- α/β einerseits und IFN- γ andererseits zeigen ein teilweise abweichendes Aktivitätsprofil. So werden z. B. die MHC class II Antigene primär

Tabelle 3. Interferon-induzierte Gene (nach M. Revel, J. Chebath, 1986)

Bezeichnung	RNA	Protein	Funktion	Interferon
2-5A Synthetase	3,6	100,67	dsRNA-aktivierte	$\alpha \beta > \gamma$
	1,8	48	Translationshemmung	
	1,6	40		
dsRNA-stimulierte Proteinkinase	?	60-70	dsRNA-aktivierte Translationshemmung	$\alpha \beta > \gamma$
C56	2,0	56	?	
pIf1	2,9	42	?	$\alpha \beta$
		58		
1-8 Genfamilie	0,8	?	?	$\alpha \beta > \gamma$
G-16	1,0	13	?	$\alpha \beta$
Thymosin β 4	0,8	5,25	Induktion der terminalen Transferase in B-Lymphocyten	
HLA-A,B,C	1,8	44	MHC Klasse 1	$\gamma > \alpha \beta$
B2-Mikroglobulin	0,9	14	MHC Klasse 1	$\gamma > \alpha \beta$
HLA-DR α	1,3	34	MHC Klasse 2	$\gamma \gg \alpha$
HLA-DR β		29		
MT-IIa	0,5	7	Metallothionin	$\alpha \beta \gamma$
GBP	4,0	67	GTP/GDP-Bindungs Protein	
MX (Maus)	3,5	72	antiviral gegen Influenzavirus	$\alpha \beta$

durch IFN- γ induziert, während das Maus-Mx-Gen ausschließlich durch IFN Typ 1 induziert wird. Dies gilt auch für das menschliche Mx-homologe Protein [89].

Es sind Beispiele einer negativen Genregulation durch Interferon beschrieben worden, z. B. das Proto-Onkogen c-myc. Im Gegensatz zur hier aufgeführten Genaktivierung scheint diese Genrepression jedoch ein sekundäres Ereignis zu sein, d. h., es wird nicht durch Interferonbindung per se vermittelt, sondern durch ein sekundär gebildetes Protein [23, 24, 48].

Die antivirale Aktivität der Zelle [27, 46]

Die antivirale Aktivität des Interferons läßt sich durch zwei Eigenschaften grundlegend von der antiviralen Aktivität der spezifischen Immunantwort des Organismus abgrenzen: 1. Interferon ist nicht virusspezifisch, aber 2. IFN ist artspezifisch.

Die „negativ“ Eigenschaft – nicht virusspezifisch – hat ihre Ursache darin, daß das Ziel der Interferonwirkung niemals das freie Virus, sondern die Zelle

ist. Diese wird durch Interferon dahingehend modifiziert, daß die Vermehrung eines infizierenden Virus blockiert wird. Die Artspezifität hat ihre Grundlage in der Spezifität der Interferon-Rezeptor-Wechselwirkung. Aufgrund der unterschiedlichen Konfiguration erkennt der humane Interferonrezeptor z. B. ein IFN der Maus wesentlich schlechter (und umgekehrt). Die intrazellulären Mechanismen der antiviralen Aktivität scheinen bei den verschiedenen Spezies identisch zu sein.

Die Induktion des antiviralen Zustands der Zelle erfordert RNA- und Proteinsynthese. Zwischen IFN-Behandlung und optimaler Induktion der antiviralen Aktivität liegen ca. 8 bis 12 Stunden. Hieraus ergibt sich, daß bei lytischen Viren mit kurzem Replikationszyklus die Interferonbehandlung der Virusinfektion zeitlich um mehrere Stunden vorausgehen muß, um einen Schutz zu bewirken. Bei Viren mit längeren Replikationszyklen, bei nicht-lytischen oder chronischen Infektionen gilt diese Bedingung nicht. Der virale Replikationszyklus läßt sich typischerweise in eine Anzahl von Einzelschritten unterteilen. In seinen Details unterscheidet sich dieser Zyklus natürlich erheblich zwischen den einzelnen Virusgruppen, da z. B. ein negativ-strängiges Rhabdovirus (VSV) eine andere Replikationsstrategie verfolgt als ein doppelsträngiges DNA-Virus (z. B. Herpes, SV40) oder ein chronisch infizierendes Retrovirus. Es gibt jedoch einige prinzipielle Schritte, die allen Viren zu eigen sind. In Tabelle 4 sind die Schritte eines typischen Replikationszyklus aufgeführt. Jeder dieser Schritte ist ein potentiell Ziel für eine antivirale Aktivität und parallel zu diesen Replikationsstadien sind Viren aufgeführt, deren Vermehrung an dem betreffenden Punkt durch Interferon gehemmt wird. Die Darstellung demonstriert, daß die Hemmung nicht an nur einem Punkt des Zyklus ansetzt, sondern daß verschiedene Hemmpunkte entlang des ganzen Zyklus identifiziert worden sind. Dies soll am Beispiel einiger Viren diskutiert werden [77].

Vesicular Stomatitis virus (VSV)

VSV gehört zur Gruppe der Rhabdoviren. Sein Genom ist eine einzelsträngige RNA negativer Polarität, welche für fünf Virusproteine kodiert. VSV ist stark hemmbar durch Interferon und wird daher im IFN-Assays häufig als Indikatorvirus eingesetzt. Für dieses relativ unkomplizierte Virus sind vier voneinander abgrenzbare Hemmpunkte identifiziert worden.

1. Das Virus bindet an einen Rezeptor an der Zelloberfläche und wird in die Zelle durch Endocytose aufgenommen. Untersuchungen mit markierten Viruspartikeln demonstrieren, daß diese Aufnahme durch Vorbehandlung mit Interferon reduziert wird.
2. Das aufgenommene Genom wird durch eine im Kapsid mitgeführte virale RNA-Polymerase transkribiert. Diese primäre Transkription ist in IFN-behandelten Zellen erheblich verringert.

Tabelle 4. Primäre Hemmpunkte der viralen Replikation durch Interferon

Replikationsphase	gehemmt bei
Adsorption	
Penetration	VSV
uncoating	HSV, SV40
primäre Transkription	VSV
Translation	EMC, VSV, Reovirus, SV40 Vacciniavirus u. a.
Genomreplikation	
Reifung/Freisetzung	Retroviren, VSV, HSV

3. Durch primäre oder sekundäre Transkription synthetisierte mRNA wird in virale Proteine translatiert und diese Synthese viraler Proteine scheint im Falle des VSV der quantitativ bedeutendste Hemmpunkt zu sein. Ein Grund für die geringe Translationseffizienz der viralen mRNA in IFN-behandelten Zellen wird in der verringerten Methylierung ihrer 5'-cap-Struktur gesehen, eine Beobachtung, die außer bei VSV auch bei verschiedenen anderen Viren gemacht wurde.
4. Eines der fünf Proteine des VSV ist ein Glykoprotein, welches in der äußeren Lipidhülle des Virions vorliegt und essentiell für die Infektiösität des Viruspartikels ist. In IFN-behandelten Mausfibroblasten (L929-Zellen) ist die Glykosilierung des Proteins reduziert, und als Folge wird von diesen Zellen nicht-infektiöses Virus freigesetzt [29, 56, 5] (Tabelle 4).

Simian Virus-40 (SV40)

SV40 ist ein dsDNA-Virus aus der Gruppe der Papovaviren. SV-40 durchläuft einen lytischen Replikationszyklus in Affenzellen, dem natürlichen Wirt des Virus. Nicht-permissive Nagerzellen werden durch SV40 transformiert, bilden jedoch keinen Nachkommenvirus. SV40 gehört zu den am häufigsten charakterisierten Viren; das Genom kodiert für zwei regulatorische frühe Proteine (large (T) und small (t) tumor antigens) und drei späte Strukturproteine. Das virale Genom ist in der transformierten Zelle in das Wirtsgenom eingebaut; unter diesen Bedingungen werden nur die frühen viralen Gene expremiert. SV40 hat einen vergleichsweise langen lytischen Replikationszyklus (> 24 h). Die Wirkung von Interferon auf SV40 konnte daher unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht werden,

- a) IFN-Behandlung ging der Virusinfektion zeitlich voraus, oder
- b) IFN-Behandlung erfolgte nach Infektion, d.h., nach Beginn der viralen Genexpression und DNA-Replikation.

ad a) In den Interferon-vorbehandelten Zellen erfolgen die ersten Schritte des Replikationszyklus normal, das sind: Adsorption, Penetration, Transport zum

Zellkern. Es wird jedoch signifikant weniger RNA der frühen Genen synthetisiert, gefolgt von einer entsprechenden Verringerung an T- und t- Antigen. Eine verstärkte Degradation der infizierenden viralen DNA in IFN-behandelten Zellen konnte als Ursache ausgeschlossen werden. Wird das zur DNA-Replikation notwendige T-Antigen in „trans“ bereitgestellt, so verläuft die Replikation auch in behandelten Zellen normal. Eine Hemmung der Transkription „per se“ ist wenig wahrscheinlich, da reine virale DNA, in die Zellen durch Transfektion eingebracht, in IFN-behandelten und Kontroll-Zellen die gleiche Transkriptionsaktivität hat. Nach den gegenwärtigen Vorstellungen wird in IFN-behandelten Zellen ein Schritt des „uncoating“ von SV40, d. h. die Entfernung des Kapsids vom viralen Genom nicht durchgeführt und der zelluläre Transkriptionskomplex kann daher an der viralen DNA nicht initiieren [9].

ad b) Ein völlig anderes Bild ergibt sich, wenn Interferon zu Zellkulturen gegeben wird, die schon replizierendes Virus enthalten. Unter diesen Bedingungen ist der unter a) eingegrenzte frühe Hemmpunkt schon überschritten, dennoch wird eine Reduktion der Virusmehrung durch Interferon erreicht. Diese wird durch eine Translationskontrolle bewirkt, die mit hoher Selektivität die Synthese viraler Proteine unterdrückt. Da T-Antigen für virale DNA-Replikation benötigt wird, wird diese sekundär auch gehemmt. Virale RNA-Synthese und RNA-Reifung (Splicing, Poly-Adenylierung) verlaufen in IFN-behandelten Zellen normal und die Stabilität der viralen RNA ist unverändert. Die Hemmung der SV40-spezifischen Proteinsynthese ist ein Idealbeispiel für eine selektive, virusgerichtete Translationskontrolle durch Interferon. Sie funktioniert nur in intakten Zellen; stellt man sich aus SV40-infizierten, IFN-behandelten Zellen zellfreie Translationssysteme her, so wird diese Selektivität nicht mehr beobachtet. Der Mechanismus dieser Translationskontrolle ist nicht erfaßt.

Neben dem Zeitpunkt der IFN-Behandlung wird die Hemmbarkeit von SV40 durch den genetischen Kontext des Virusgenoms modifiziert. Ist die virale DNA in das zelluläre Genom eingebaut, so hat Interferon keinen Effekt auf virale Transkription und Translation, obwohl über-infizierendes SV40-Virus in der gleichen Zelle hemmbar ist. Einen ähnlichen Schutz erreicht man durch Einbau der SV40 DNA in das Genom eines IFN-resistenten Adenovirus; in solchen Hybridviren ist die SV40-Genexpression gegen IFN-Behandlung resistent.

Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV1)

HSV1 ist ein lytisches DNA Virus aus der Herpesgruppe. Sein Genom hat eine Größe von ca. 150 Kilobasen und kodiert für 50–80 virale Gene. Die Gene werden nach dem Zeitpunkt ihrer Expression im Replikationszyklus in drei Klassen eingeteilt – „immediate early“ (ie), „early“ und „late“. Proteine der „ie“ Gene sind Aktivatoren/Regulatoren der beiden späteren Gengruppen, „early“ Gene kodieren für Funktionen der Virusreplikation und „late“

Gene hauptsächlich für Strukturproteine des Virions. Die Analyse der viralen Replikation in Makrophagen und Fibroblasten zeigte eine Hemmung der Genexpression aller drei Gengruppen durch Interferon. Virusaufnahme und Transport der DNA zum Zellkern waren identisch in Kontroll- und IFN-behandelten Kulturen. Die virale DNA-Replikation war jedoch stark reduziert als Folge der gehemmten „ie“ und „early“ Expression. Als wahrscheinlicher Hemmpunkt konnte die Transkription der „ie“ Gene identifiziert werden, die nach Interferonbehandlung signifikant reduziert war. Das sich abzeichnende Bild ähnelt dem bei SV40 und deutet auf einen möglichen generellen Hemmechanismus für solche DNA-Viren, die im Kern der Wirtszelle replizieren [81, 21, 22, 58].

Neben dieser „frühen“ Hemmung wurde ein weiterer Zielpunkt der antiviralen Aktivität spät im Zyklus des HSV1 beschrieben, der analog zu dem Befund mit VSV zu einer verminderten Synthese eines bestimmten Virusglykoproteins führte und somit zu einer Hemmung der Virusreifung und Freisetzung [13].

Eine späte Hemmung jenseits viraler Nukleinsäure- und Proteinsynthese ist für die Gruppe der Retroviren in chronisch-infizierten Zellen beschrieben worden. Wegen des inhaltlichen Zusammenhangs von Retroviren mit zellulärer Transformation und Onkogenen ist diese Hemmung in dem Kapitel über Interferon und Onkogene dargestellt.

DsRNA-aktivierte antivirale Mechanismen

Im Vorhergehenden wurde die antivirale Aktivität aus der Perspektive der viralen Replikation betrachtet mit der Fragestellung, welche Virusfunktion durch IFN-Behandlung beeinflusst wird. Im Folgenden soll die Perspektive verändert werden in Richtung auf die Frage, welche IFN-regulierten, zellulären Faktoren diese Virushemmung bewirken. Ich werde die Diskussion dieser Frage auf die Hemmung der viralen Translation durch Interferon beschränken, da nur zu diesem Punkt experimentell hinreichend abgesicherte Modelle existieren. In diesem Zusammenhang wird die doppelsträngige RNA (dsRNA) wieder eine zentrale Rolle einnehmen, wie schon zuvor bei der IFN-Induktion.

Das 2-5A-System [47]

Die Proteinbiosynthese in zellfreien Extrakten aus IFN-behandelten Zellen ist hemmbar durch dsRNA in der Gegenwart von ATP. Als ein Mediator dieser Hemmung wurde ein Adenyl-oligonukleotid der allgemeinen Formel $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}(2', 5')$ -Oligoadenylat (im Folgenden abgekürzt als 2-5A) identifiziert. Die Länge dieses 2-5A beträgt 1 bis 15 Nukleotide, wobei die physiologisch dominierenden Spezies die Dimere bis Tetramere sind. Das Trimer ist die kleinst inhibitorische Form des 2-5A. Gebildet wird das 2-5A durch das IFN-induzierte Enzym Oligoadenylatsynthetase (2-5A-Synthetase). Dieses

Enzym ist innerhalb weniger Stunden nach IFN-Behandlung in der Zelle nachweisbar, ist jedoch primär inaktiv. Die Aktivierung erfolgt durch dsRNA, welche in direkte Wechselwirkung mit der 2-5A-Synthetase treten muß. Das Substrat der Reaktion ist ATP, das Produkt die verschiedenen Formen des 2-5A und Pyrophosphat.

Es sind verschiedene Formen der humanen 2-5A-Synthetase nachgewiesen worden von 40-, 46-, 67- und 100 kd Molekulargewicht [14]. Die Gene der beiden kleinen Formen sind identifiziert und sequenziert worden. Antikörper gegen die 40 kd- und 46 kd-Form kreuzreagieren mit den großen Spezies, so daß auf erhebliche Homologien geschlossen werden kann. Die vier Formen der 2-5A-Synthetase sind möglicherweise auf verschiedene Zellkompartemente verteilt; sie unterscheiden sich in den zur Aktivierung notwendigen Konzentrationen von dsRNA. Hinweise auf funktionelle Unterschiede gibt es bisher nicht. Das Produkt der Synthesereaktion, das 2-5A, bindet spezifisch an ein zelluläres Protein. Dieses Protein von ca. 80 kd wurde als eine zumeist konstitutiv exprimierte Endoribonuklease identifiziert, die aber wie die Synthetase primär inaktiv ist. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von 2-5A an diese Nuklease. Die aktivierte Nuklease spaltet einzelsträngige RNA am 3' der Sequenzen UA, UG oder UU, sie zeigt in vitro keine Selektivität für virale RNAs. Die Bindung von 2-5A an das Protein ist reversibel, nach Dissoziation des Liganden geht die Nuklease wieder in den inaktiven „Normalzustand“ über. Das 2-5A in Zellextrakten hat eine biologische Halbwertszeit in der Größenordnung weniger Minuten, die Inaktivierung erfolgt zum einen über Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen durch unspezifische Phosphatasen, zum anderen durch eine spezifische 2',5'-Phosphodiesterase. Die 5'-monophosphorylierten bzw. dephosphorylierten Formen des 2-5A binden zwar noch an die Nuklease, aktivieren diese jedoch nicht mehr und können wegen der Bindungskompetition als physiologische Antagonisten der aktiven 5'-Tri- und Diphosphat-Formen angesehen werden.

Wie lassen sich nun diese Einzelkomponenten zu einer IFN-induzierten Translationskontrolle zusammenstellen, die eine selektive Hemmung viraler Proteinsynthese ausübt? In der IFN-behandelten Zelle ist die 2-5A-Synthetase um das 10–100fache der Kontrollzellen erhöht, sie ist jedoch primär inaktiv, da der Aktivator *dsRNA* fehlt. Die dsRNA wird erst gebildet, wenn Virus die Zelle infiziert und dort repliziert. Da die 2-5A-abhängige Nuklease jedoch keine Spezifität für virale RNA aufweist, sollte ein aktiviertes 2-5A-System via erhöhter RNA-Degradation zu einer generellen Hemmung der Proteinsynthese führen. Diese wird auch beobachtet, wenn 2-5A selbst durch experimentelle Manipulation in Zellen eingebracht wird. Im Falle einer Virusinfektion mit wenigen infektiösen Partikeln pro Zelle läßt sich jedoch eine selektive Hemmung viraler Proteinsynthese nachweisen. Dieser scheinbare Widerspruch wird mit der Hypothese einer „localized activation“ der 2-5A-abhängigen Nuklease erklärt. Die zur Aktivierung der Synthetase notwendige dsRNA wird durch die partiell doppelsträngige Form replizierender und transkribierender RNA-Viren bereitgestellt. An diesem Synthetase-dsRNA-Komplex wird 2-5A gebildet. Wegen der geringen biologischen Stabilität des

2-5A kommt es aber nur in der Nähe dieses Komplexes zu einem Anstieg der 2-5A-Konzentration, der zur Aktivierung der Nuklease ausreicht. Aktivierte Nuklease ist somit auch auf die Nachbarschaft aktivierter Synthetase beschränkt und wird deshalb nur in diesem Bereich RNA abbauen. Zu dieser präferentiell abgebauten RNA sollte mit einiger Wahrscheinlichkeit der einzelsträngige Anteil der viralen RNA sein, z. B. naszierende mRNA, die noch mit dem Virusgenom verbunden ist. Für dieses Modell gibt es einige experimentelle Belege. Es ist gezeigt worden, daß in Extrakten von IFN-behandelten Zellen ein partiell doppelsträngiges RNA Hybrid (z. B. eine mRNA, die durch Hybridisierung mit synthetischem polyU am 3'Ende in eine partiell doppelsträngige Form überführt wurde) deutlich weniger stabil ist als die rein einzelsträngige (ss) Form [61]. Eine selektive Degradation viraler mRNA wurde bei der in vitro Transkription an Reoviruscapsiden in Extrakten von IFN-behandelten Zellen gefunden. Diese Degradation war durch Antagonisten des 2-5A hemmbar, ein Indiz für eine kausale Rolle des 2-5A-Systems [1].

2-5A wurde auch in IFN-behandelten Zellen nach Infektion mit DNA-Viren (HSV-1, Vaccinavirus, SV40) gefunden. Dies ist ein Hinweis, daß auch in diesen Infektionen dsRNA gebildet wird, z. B. durch überlappende Transkripte von komplementären DNA-Abschnitten. Im Falle dieser Viren wird das Bild jedoch weiter kompliziert, da neben authentischem, aktiven 2-5A auch in hohen Konzentrationen 2-5A-ähnliche Oligonukleotide gefunden wurden, die zwar mit authentischem 2-5A um Bindung an die Nuklease kompetieren können, diese aber nicht aktivieren. Sie bewirken somit eine kompetitive Hemmung des 2-5A-Systems. Chemisch sind diese Antagonisten des 2-5A bislang nur unvollkommen charakterisiert. Man könnte sie als eine virale Verteidigungsstrategie gegen einen zellulären, antiviralen Mechanismus betrachten [42, 71].

Es gibt Hinweise auf eine Bedeutung des 2-5A-Systems außerhalb der antiviralen Mechanismen. Eine Erhöhung der 2-5A-Synthetase und Nuklease wurde in wachstumsgehemmten und differenzierenden Zellkulturen gemessen, desgleichen wurde unter diesen Bedingungen 2-5A in der Zelle nachgewiesen. Die Rolle eines zellulären Aktivators der Synthetase kann durch nicht-prozessierte mRNA (hnRNA) im Nukleus übernommen werden. Im regenerierenden Lebergewebe der Maus wurden deutlich geringere Synthetaseaktivitäten gemessen als im normalen Lebergewebe, desgleichen veränderte sich die Synthetaseaktivität in Oviduktzellen des Huhns umgekehrt zur Östrogen-abhängigen Zellstimulation [25]. Diese reziproke Korrelation von Synthetaseaktivität und Zellwachstum könnte auf eine Rolle in der Wachstumskontrolle hindeuten.

Das 2-5A-System ist sicherlich nur eine Komponente einer multifaktoriellen antiviralen und antiproliferativen Aktivität von Interferon und es wäre unzulässig vereinfachend, die Vielzahl der biologischen Aktivitäten des Interferons primär mit diesem System erklären zu wollen. Die vorhandenen Befunde stützen dessen Rolle als einen Mechanismus in der Abwehr einer Anzahl von RNA-Viren, alle weiteren Funktionen aber sind momentan noch hy-

pothetisch und müßten experimental belegt werden. Die Bestimmung der 2-5A-Synthetaseaktivität jedoch ist ein spezifischer und sensitiver Marker für eine vorhergehende „produktive“ Interaktion von Interferon und Zelle und als solcher für viele Fragestellungen auch in der klinischen Forschung aussagekräftig.

Die dsRNA-aktivierte Proteinkinase (dsRNA-PK) [47]

Die IFN-induzierte Proteinkinase ist die zweite Komponente der dsRNA-abhängigen Translationskontrolle. Die PK wird durch Interferon induziert, ist aber wie die 2-5A-Synthetase primär inaktiv und wird wie diese durch dsRNA in der Gegenwart von ATP aktiviert. Die aktivierte Proteinkinase phosphoryliert a) sich selbst und b) die kleine Untereinheit (α) des Initiationsfaktors 2 der Proteinsynthese eIF-2 α . Die physiologische Relevanz der Autophosphorylierung ist ungeklärt, die Phosphorylierung von eIF-2 α jedoch ist ein bekanntes Regulationsprinzip, wie es z. B. auch bei der Häm-in-abhängigen Translationskontrolle der Globinsynthese in Retikulozyten gefunden wird. Initiationsfaktor eIF-2 α bildet mit GTP und Met-tRNA den „ternären“ Komplex, der Basis ist für einen frühen Schritt der Translationsinitiation, nämlich die Anlagerung freier mRNA an die kleine (48s) ribosomale Untereinheit. Im weiteren Verlauf löst sich der eIF-2/GTP-Komplex unter Hydrolyse des GTP zu GDP und die große ribosomale Untereinheit bindet an die 48s Einheit unter Bildung des 80s Initiationskomplexes, von dem die Elongation, d. h. die eigentliche Synthese des Proteins, startet. Um eIF-2 in die Initiations-aktive Form zurückzuführen, muß das gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht werden. Dieser Austausch wird durch ein weiteres Protein bewirkt, das der begrenzende Faktor in dieser Reaktionskette ist. Phosphorylierung des eIF-2 α durch die dsRNA-PK hemmt diese GDP/GTP-Austauschreaktion durch irreversible Bindung des Austauschfaktors an den eIF-2/GDP-Komplex. Die Folge ist eine Akkumulation von eIF-2 als inaktiver eIF-2/GDP-Komplex und als Konsequenz eine Hemmung der Proteinsynthese auf der Stufe der Initiation.

Ähnlich dem 2-5A-System fehlt auch der PK-vermittelten Hemmung primär eine Selektivität für virale mRNA, so daß auch ihre Aktivierung eine generelle Hemmung der Proteinsynthese zur Folge haben sollte. Kürzlich sind aber auch hier Daten für einen „localized activation“-Mechanismus vorgelegt worden. Selektive Phosphorylierung von eIF-2 α in Initiationskomplexen mit naszierender mRNA von Reovirus-Transkriptionskomplexen führte zu einer bevorzugten Anhäufung von inaktiven eIF-2 in 48s-Initiationskomplexen mit viraler mRNA, während die Initiation mit zellulärer mRNA im gleichen System nicht gehemmt war.

Insgesamt ist die Rolle der dsRNA-PK in der antiviralen Aktivität weniger belegt als die des 2-5A-Systems, jedoch sind auch hier Modelle einer Infektion mit RNA-Viren gute Kandidaten, und eine Phosphorylierung von PK

und eIF-2 α in IFN-behandelten, Reovirus oder VSV infizierten Zellen ist wiederholt gezeigt worden.

Wie beim 2-5A-System, so auch im Falle der PK scheinen DNA-Viren Strategien entwickelt zu haben, um diese Hemmung zu umgehen. Dies wurde für Vaccinia und Adenovirus berichtet. Für beide Viren ist gezeigt worden, daß Überinfektionen mit VSV in IFN-behandelten Zellen die normalerweise beobachtete Hemmung des VSV aufheben und diese Reversion der Virushemmung mit einer Reduktion der PK-Aktivität verbunden ist. Im Falle von Adenovirus konnte die virale Funktion, welche die PK blockiert, identifiziert werden. Es handelt sich um die VAI-RNA, eine ca. 160 Basen große RNA, die hauptsächlich spät im Replikationszyklus synthetisiert wird. VAI-RNA blockiert die Aktivierung vor PK durch dsRNA in vitro und in vivo und eliminiert somit diesen dsRNA-aktivierten antiviralen Mechanismus. VAI-RNA bildet einen direkten Komplex mit der PK und unterbindet möglicherweise so die Bindung von dsRNA, ohne jedoch selbst die PK zu aktivieren. Adenoviren, aus deren Genom das VAI-Gen deletiert wurde, bewirkten keine Hemmung der PK [26, 88, 49, 70].

Andere antivirale Aktivitäten, wie z.B. verringerte Methylierung der 5'-Cap-Struktur von mRNA, verringerte Glycosilierung viraler Proteine bzw. Hemmung des „uncoating“ oder der Transkription sind beschrieben worden. Da jedoch in keinem dieser Fälle die zellulären Komponenten dieser Aktivitäten identifiziert worden sind, können sie hier nicht hinsichtlich ihres Mechanismus diskutiert werden.

Antivirale Aktivität im Tiermodell [35]

Die Untersuchungen zur antiviralen Aktivität von Interferon im Tiermodell lassen sich in zwei grundlegende Fragestellungen untergliedern:

- a) Bewirkt exogenes Interferon einen Schutz in experimentellen Virusinfektionen, und
- b) wird während experimenteller Infektionen endogenes Interferon gebildet, und hat dieses endogene Interferon eine Bedeutung für den Verlauf der Infektion.

Die erste Frage ist in vielen Modellen verschiedener Tierspezies positiv beantwortet worden und in Anbetracht der gegenwärtigen klinischen Anwendung des Interferons bei Virusinfektionen von eher historischem Interesse [44]. Ich möchte mich hier der zweiten Frage zuwenden, in der es um die physiologische Relevanz des Interferons geht und möchte diese am Beispiel einiger Mausmodelle versuchen zu beantworten.

Das Mx-Modell

Ingezüchtete Mäusestämme unterscheiden sich in ihrer Resistenz gegen Orthomyxoviren; resistent sind z.B. Mäuse des A2G-Stammes, susceptibel sind Balb/c-Mäuse. Diese Unterschiede wurden in intracerebralen, intranasalen

und intraperitonealen Infektionsmodellen gefunden und deuten somit im Falle der A2G-Maus auf eine systemische Resistenz hin. Die Unterschiede wurden nicht mit Stämmen des Influenzavirus gefunden, die vergleichsweise schlechte IFN-Induzenten waren, waren aber sehr ausgeprägt bei „gut induzierten“ Virusstämmen. Ein neutralisierendes Antiserum gegen IFN- α/β durchbrach die Abwehr resistenter A2G-Mäuse, während aber andererseits susceptible Balb/c-Mäuse durch exogenes Interferon nicht resistent wurden; Unterschiede in der Interferoninduktion per se schieden somit aus. Makrophagen, Hepatocyten oder Fibroblasten von A2G-Mäusen, jedoch nicht von Balb/c, waren in Kultur durch Behandlung mit Interferon gegen Influenzavirus schützbar. Mit Picorna-, Rhabdo- oder Herpes-Viren wurden diese Unterschiede nicht beobachtet. Insgesamt sprachen diese Befunde für einen zellulären, IFN-induzierten, antiviralen Mechanismus mit hoher Spezifität für Orthomyxoviren in A2G-Mäusen und dessen Abwesenheit in Balb/c-Tieren [38, 39].

In einer Serie von Experimenten wie Einkreuzung des Resistenzlocus (genannt: Mx) in den genetischen Hintergrund vor Balb/c, Identifizierung des Mx-Proteins durch monoklonale Antikörper, Klonierung der Mx-cDNA bzw. des Mx-Gen und dessen Expression in Mx-negativen Rezipienten ist dieser antivirale Mechanismus inzwischen weitgehend aufgeklärt [80]. Resistenz wird bewirkt durch ein Protein (Mx-Protein), das durch IFN- α/β , aber nicht durch IFN- γ , induziert wird. Das Mx-Protein ist im Nukleus lokalisiert, wo auch die Replikation von Influenzavirus erfolgt. In Mx-positiven Kernen ist die Replikation dieser Viren unterdrückt. Die Biochemie dieser Hemmung ist noch nicht vollständig verstanden, die bisherigen Daten sprechen für eine Reduktion der primären Transkription von Influenzavirus [53].

Das HSV1-Modell

Auch bei diesem Modell war der Ausgangspunkt die Frage nach der physiologischen Grundlage einer genetisch determinierten Resistenz verschiedener ingezüchteter Mausstämmen, in diesem Falle gegen Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV1). In suszeptiblen DBA/2 oder Balb/c Mäusen nimmt eine intraperitoneale Infektion mit wenigen infektiösen Viruspartikeln einen letalen Verlauf, während resistente C57 BL/6 Mäuse eine Infektion mit 100–1000fach höheren Virusdosis überleben. Es wurde gezeigt, daß in diesem Modell die Interferonproduktion, oder exakter, die Kinetik der Interferonproduktion von entscheidender Bedeutung für den Infektionsverlauf ist und daß Peritonealmakrophagen hier eine wichtige Rolle spielen. Diese Makrophagenpopulation ist ein Zielpunkt des Virus, in der primäre Infektion und Replikation ablaufen. Gleichzeitig induziert HSV1 Interferon, welches von den Makrophagen sezerniert wird. Der weitere Verlauf der Infektion kann als das Ergebnis eines Wettlaufs zwischen Interferonproduktion und Virusreplikation betrachtet werden. In resistenten C57BL/6-Mäusen ist innerhalb weniger Stunden nach Infektion Interferon im Peritoneum nachweisbar. Dieses frühe In-

terferon kann in den Peritonealzellen eine antivirale Aktivität induzieren und diese somit vor sekundärer Virusinfektion schützen – die Virusinfektion bleibt infolgedessen weitgehend auf die primär infizierten Zellen beschränkt. In suszeptiblen DBA/2-Mäusen erfolgt die IFN-Produktion weniger schnell und weniger stark. Das Nachkommenvirus der Primärinfektion erreicht somit seine Zielzellen vor dem Interferon und kann eine nächste Replikationsrunde beginnen, die letztlich zur lethalen Virämie führt. Eine Injektion von exogenem Interferon in suszeptible Mäuse zum Zeitpunkt der Infektion gibt diesen den Phänotyp der resistenten Tiere, während umgekehrt resistente Mäuse durch Injektion eines IFN- α/β -Antiserums suszeptibel für HSV1 werden. Im Gegensatz zum Mx-Modell ist in diesem HSV1-Modell nicht ein IFN-induzierter, antiviraler Mechanismus, sondern die Interferonproduktion per se der kritische Faktor der determinierten Resistenz. Aus diesem Modell läßt sich ein Schluß ableiten, der wahrscheinlich generelle Bedeutung für die Rolle des IFN-Systems hat. Interferonproduktion ist ein früher Abwehrmechanismus des Organismus, der innerhalb weniger Stunden nach Infektion aktiviert wird. Strategisches Ziel dieses Abwehrmechanismus ist wahrscheinlich nicht so sehr die Elimination einer Virusinfektion, sondern deren lokale Begrenzung und Verzögerung bis zum Einsetzen anderer, spezifischer Abwehrreaktionen des Immunsystems [91].

Neutralisierendes Antiserum gegen IFN- α/β ist in einer Reihe von Maus-Virus-Modellen eingesetzt worden, um die Rolle der endogenen IFN-Produktion zu untersuchen, z. B. bei EMCV, Polyomavirus, Moloney Sarcoma Virus und Coronavirus. In einer Anzahl dieser Experimente wurden durch Injektion des Antiserums die Symptome der Infektion verstärkt, es wurden generalisierte Virämien beobachtet und eine Erhöhung der Mortalitätsrate festgestellt [35]. In ihrer Gesamtheit demonstrieren diese Daten eine signifikante Beteiligung der Interferone an der Abwehr viraler Infektionen im Organismus.

Mechanismen der antiviralen Aktivität im Tiermodell

In den vorangehenden Kapiteln wurden am Beispiel einiger Viren bzw. der dsRNA-aktivierten Enzymsysteme die antiviralen Mechanismen dargestellt, die in der infizierten, IFN-behandelten Zelle ablaufen und deren Angriffspunkt das replizierende Virus selbst ist. Diese Darstellung impliziert natürlich, daß diese Mechanismen auch bei der antiviralen Aktivität des Interferons im Organismus eine Rolle spielen. Diese Annahme ist gerechtfertigt, aber nicht eindeutig bewiesen, da vergleichbare biochemische Untersuchungen im Tier nicht durchzuführen sind. Es gibt indirekte Hinweise in Einzelbeispielen, wie z. B. die Rolle des Mx-Gens in der Resistenz gegen Influenzavirus oder der Nachweis von 2-5A in Virus-infizierten Organen der Maus [41]. Zusätzlich zu diesen „direkten“ Mechanismen gibt es aber mit Sicherheit im Organismus weitere Funktionen der unspezifischen und spezifischen Abwehr, die durch Interferon aktiviert werden und zur antiviralen Aktivität beitragen,

z. B. Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen oder cytotoxische T-Zellen. Das Ziel dieser Mechanismen wäre also nicht das Virus per se, sondern die infizierte Zelle.

Es ist gezeigt worden, daß systemische Behandlung mit IFN- α Rhesusaffen gegen intradermale Infektion mit Vacciniavirus schützt, primäre Hautfibroblasten und Nierenzellen jedoch durch IFN- α nicht schützbar waren. Dies kann als ein Hinweis für eine indirekte antivirale Aktivität von Interferon in diesem Infektionsmodell gelten [73]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von immunosuppressiven Therapeutika auf die Aktivität von Interferon bei VSV- und Pseudorabies-Infektionen in der Ratte. Cyclosporin A, Azothioprim und Prednisolon hatten keinen Einfluß auf den IFN-vermittelten Schutz, während Cyclophosphamid diesen Schutz partiell aufhob [74]. In vitro wurde gezeigt, daß Interferon die Suszeptibilität von LCMV (Lymphocytäres Choriomeningitis Virus)- oder Vacciniavirus-infizierten Fibroblasten gegen cytotoxische T-Zellen erhöhte [9]. Wahrscheinlicher Mechanismus ist die verstärkte MHC Klasse 1-Expression durch Interferon, durch welche die Virus-infizierten Zellen zu einem besseren Ziel der zytolytischen Aktivität werden.

Synergismus

Das komplexe Bild der antiviralen Aktivität von Interferon müßte noch erweitert werden durch die Einbeziehung anderer Cytokine bzw. Kombination von IFN- α/β mit IFN- γ . Ich habe bei der Beschreibung der Interferone erwähnt, daß IFN- α/β einerseits und IFN- γ andererseits ein teilweise unterschiedliches Aktivitätsspektrum haben. Übereinstimmend hiermit ist mehrfach gefunden worden, daß sich bei kombinierter Behandlung mit IFN- α oder IFN- β und IFN- γ die antiviralen bzw. antiproliferativen Aktivitäten potenzieren [19]. Dieser synergistische Effekt ist ein Hinweis auf verschiedene Wirkungsmechanismen. Desgleichen läßt sich die antivirale Aktivität von Interferon in Zellkulturen durch geringe Mengen von Tumor-Nekrose Faktor (TNF) synergistisch steigern. Da möglicherweise alle diese Cytokine in vivo unter den Bedingungen einer Virusinfektion gebildet werden, könnte dieser in Zellkulturen beobachtete Synergismus von biologischer und therapeutischer Relevanz sein.

Die antiproliferative Aktivität

Die Erstbeschreibung einer Wachstumshemmung durch Interferon in Kulturen von Mausfibroblasten erfolgte schon kurz nach dessen Entdeckung als antivirale Substanz. Wegen der möglichen Kontamination der verwendeten Interferonpräparationen mit anderen Proteinen erfuhr diese Aktivität des Interferons jedoch nur eine geringe Akzeptanz. Erst der Nachweis einer Wachstumshemmung durch biochemisch reines bzw. rekombinantes Interferon vor

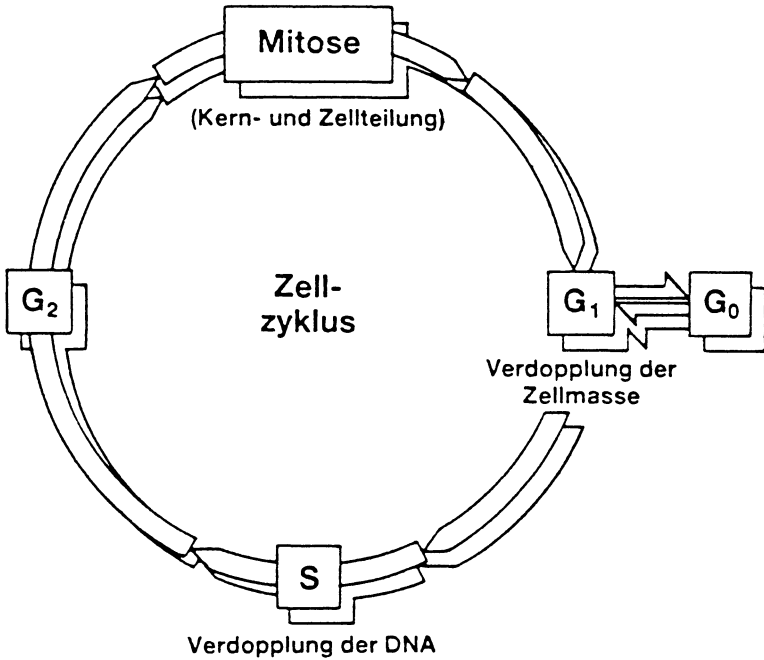


Abb. 3. Die Phasen des Zellteilungszklus

ca. 10 Jahren führt zur Anerkennung der antiproliferativen Aktivität als eine intrinsische Eigenschaft von Interferon. De facto sind Interferone heute die am weitesten charakterisierten „negativen“ Wachstumsfaktoren, obwohl unser Verständnis dieser antiproliferativen Wirkung noch weniger entwickelt ist als das der antiviralen Wirkung. Antiproliferativ wirken Interferone aller drei Typen; frühere Berichte, wonach IFN- γ in dieser Hinsicht eine höhere spezifische Aktivität aufweist als IFN- α/β haben sich nicht als generelles Phänomen bestätigt. Wie beim antiviralen, so auch beim antiproliferativen Effekt führt Kombination von IFN- α/β mit IFN- γ zu einer synergistischen Wirkung. Die Wachstumshemmung durch Interferone ist reversibel, für IFN- γ wurde in Einzelfällen eine zytotoxische Wirkung berichtet, es ist jedoch nicht bewiesen, daß diese mechanistisch mit der zytostatischen Wirkung verbunden ist (Abb. 3).

Interferon und Zellzyklus [79]

Als Einstieg in die Analyse der antiviralen Mechanismen sind die Wirkungen von Interferon auf die Replikationszyklen verschiedener Viren beschrieben worden. Auch im Falle der antiproliferativen Aktivität war eine mehrfach versuchte experimentelle Annäherung an ihre Mechanismen die Beschrei-

bung der Effekte von Interferon auf die verschiedenen Phasen des zellulären Replikationszyklus. Ich möchte einige dieser Arbeiten aus zwei Perspektiven diskutieren:

a) Wirkung von Interferon auf die Stimulierung von wachstumsarretierten Zellen, und

b) Wirkung von Interferon auf proliferierende Zellkulturen.

ad a) Das typische System dieser Arbeiten sind primäre Fibroblastenkulturen von Balb/c- oder Swiss3T3-Mäusen. Diese Zellen zeigen normales Wachstumsverhalten, d. h., sie brauchen exogene Wachstumsfaktoren (zumeist durch Serum bereitgestellt, aber durch definierte Wachstumsfaktoren ersetzbar), sie brauchen eine feste Oberfläche zur Anheftung (anchorage-dependence) und sie stellen das Wachstum bei Konfluenz des Zellrasens ein (density dependent growth inhibition). In wachsenden Kulturen sind die Zellen statistisch über die verschiedenen Zyklusphasen (G_1 -S- G_2 -M) verteilt. Durch Manipulation der Kulturbedingungen, typischerweise Reduktion der Serumkonzentration oder Überwachsen des Zellrasens, läßt sich die gesamte Population in dem Wachstum-inaktiven G_0/G_1 -Zustand arretieren. Der experimentell interessante Aspekt dieses Systems ist die Möglichkeit, durch Zugabe von Wachstumsfaktoren/Serum eine G_0/G_1 -arretierte Kultur synchron in Richtung S-Phase/Replikationszyklus zu bewegen und somit die Physiologie des Übergangs vom inaktiven zum aktiven Wachstumszustand zu analysieren. Die hierbei wesentlichen Wachstumsfaktoren sind z. B. PDGF, EGF, IGF, Insulin. Funktionell lassen sie sich untergliedern in Kompetenzfaktoren (PDGF) und Progressionsfaktoren (EGF, IGF, u. a.). Kompetenzfaktoren bewirken eine Prä-Aktivierung der inaktiven Zellen, sind aber allein nicht ausreichend, um den G_1/G_0 nach S-Übergang zu induzieren. Dieser erfolgt innerhalb von ca. 10–20 Stunden nach gleichzeitiger oder sukzessiver Behandlung mit Kompetenz- und Progressionsfaktoren. PDGF induziert eine Anzahl von „Kompetenzgenen“, zu denen u. a. die Proto-Onkogene c-myc und c-fos gehören.

Die Wirkung von Interferon- α/β auf den G_1/G_0 -S-Übergang ist eingehend untersucht worden. Behandlung mit Interferon vor der Stimulation mit PDGF verringert den Anteil der Zellen, die diesen Übergang durchlaufen. Diese Hemmung korreliert mit verringerter c-myc- und c-fos-Expression. Es erfolgt jedoch keine generelle Hemmung der biologischen Wirkung von PDGF, da z. B. die PDGF-aktivierte Glucoseaufnahme durch Interferon nicht reduziert wird. Die Hemmung der PDGF-Wirkung durch Interferon erfolgt daher nicht auf der Ebene des PDGF-Rezeptors, sondern an einem nachfolgenden Schritt. Für c-myc wurde gezeigt, daß dessen Hemmung durch ein IFN-induziertes Protein vermittelt wird. Neben c-myc und c-fos wird auch die PDGF bzw. Serum vermittelte Induktion der Ornithindecaboxylase und Poly(ADP-Ribose)-Synthetase durch Interferon reduziert, die beide eine Funktion für die DNA-Replikation haben. Zusammenfassend beweisen diese Daten eine Hemmung der PDGF-abhängigen „Kompetenzinduktion“ durch Interferon [23, 24].

Ähnliche Ergebnisse wurden an primären Endothelzellkulturen vom Rind erhalten. In diesem System wurde weiterhin durch IFN-Behandlung zu verschiedenen Zeiten nach PDGF-Stimulierung der Einfluß von Interferon auf die Progressionsphase untersucht. Bestimmung der DNA-Synthese in der S-Phase ergab, daß auch in der Progressionsphase die Wachstumsstimulation durch Interferon noch hemmbar ist, was auf einen weiteren Hemmpunkt jenseits der „Kompetenzinduktion“ schließen läßt. Durch Erhöhung der Wachstumsfaktorkonzentration bzw. Zugabe mehrerer Wachstumsfaktoren war die anti-mitogene Wirkung von Interferon teilweise reversibel [43].

ad b) In aktiv-wachsenden Kulturen sind die Zellen statistisch über die verschiedenen Zyklusphasen verteilt. Dieser Zustand ist typisch für normale Zellen in der Gegenwart von Wachstumsfaktoren und insbesondere für Kulturen transformierter Zellen, da diese häufig wegen einer autokrinen Produktion von Wachstumsfaktoren nur eine geringe Abhängigkeit von exogener Wachstumsstimulation aufweisen. Interferonbehandlung führte auch hier zur Wachstumshemmung, wobei Grad der Hemmung und notwendige IFN-Menge eine ganz erhebliche Bandbreite aufweisen. Spezielle Effekte auf eine bestimmte Zellphase wurden primär nicht beobachtet. Berichtet wurden Verlängerung von G_1 , $S + G_2$ -Phase oder auch Mitose. In einigen Systemen kam es letztlich zur Arretierung des Zellwachstums in einer Phase, wobei diese nicht unbedingt in G_1/G_0 erfolgte, sondern z. B. im Falle einer Glioma-Linie auch in der S-Phase [23, 24, 55].

Generelle Unterschiede zwischen normalen und transformierten Zellen hinsichtlich ihrer Sensivität zu Interferon bestehen nicht.

Wirkung auf Zellphysiologie und -morphologie [83]

Der Zellteilungszyklus läßt sich in zwei Subzyklen zerlegen: Die Replikation des Genoms in der S-Phase und dessen Aufteilung in der M-Phase einerseits und die Verdopplung der Zellmasse (Membranen, Organellen, Zytoplasma) andererseits. Diese Wachstums- und Verteilungszyklen laufen normalerweise koordiniert ab. Die antiproliferative Wirkung von Interferon äußert sich zuerst in einer gegenüber unbehandelten Zellkulturen verminderten Teilungsrate und einer parallelen Reduktion der DNA-Synthese. Protein- und RNA-Synthese können für einen gewissen Zeitraum noch normal verlaufen, so daß eine IFN-Behandlung zu einer Zunahme des Zellvolumens und der Zellmasse führen kann [72]. Sekundär werden auch diese Synthesen reduziert. Von der Hemmung der DNA-Replikation nimmt man an, daß sie in einem kausalen Zusammenhang zur Proliferationshemmung steht. Biochemische Analyse dieser Hemmung ergaben ein komplexes, nur teilweise verstandenes Bild. Interferonbehandlung bewirkt keine Hemmung der DNA-Synthese „per se“, da die Sytheserate, gemessen als Einbau von Nukleotiden in DNA-Fragmente (Okazaki-Fragmente), nur unwesentlich verändert ist. Verringert hingegen ist der Einbau dieser Fragmente in stabile, hochmolekulare DNA und eine wahrscheinliche Erklärung ist eine erhöhte „turnover“ Rate dieser neu-

gebildeten DNA. Dieser verstärkte „turnover“ könnte verschiedene Ursachen haben; es könnte erhöhte Nukleasenaktivität sein, es könnte aber auch ein Ungleichgewicht zwischen DNA-Synthese und Synthese von Kernproteinen, z. B. Histonen, sein, welche für die Chromatisierung und somit Stabilisierung „de novo“ synthetisierter DNA essentiell sind [17].

In diesem Zusammenhang sind zwei andere Beobachtungen interessant:

1. Bei akuten Infektionen mit Retroviren verlaufen virale RNA und cDNA-Synthese in Kontroll- und IFN-behandelten Zellen gleich ab, in letzteren ist jedoch die Integration viraler DNA in das Zellgenom reduziert. Diese Integration der viralen DNA in die Wirts-DNA ist der entscheidende Schritt bei der Etablierung einer chronischen Infektion und Transformation.
2. Bei Transfektionen mit reiner DNA vermindert Interferon die Zahl der stabil transfektierten Zellen, d. h., diejenigen Zellen, welche die Fremd-DNA in das Zellgenom einbauen und exprimieren. Es wäre vorstellbar, daß die antivirale Wirkung bei akuten Retrovirusinfektionen, die Hemmung einer „artifizialen“ Transfektion und die Hemmung der zellulären DNA-Replikation auf den gleichen Mechanismus zurückzuführen sind.

In Interferon-behandelten Daudi-Zellen nahm die Zahl der Membranrezeptoren für Transferrin und Insulin innerhalb von 24 Stunden erheblich ab [8, 65]. Im Falle des Insulinrezeptors wurde diese Abnahme nur in IFN-sensitiven Daudi-Zellen, jedoch nicht in IFN-resistenten Subklonen gemessen. Beide Effekte könnten mit der Wachstumsbehandlung in einem kausalen Zusammenhang stehen, sind aber sicherlich nicht die primären Schritte einer solchen Hemmung.

Interferon- γ erhöht in menschlichen Zellen die Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase, ein Enzym, welches den Abbau der Aminosäure Tryptophan einleitet. Die Induktion erfolgt innerhalb von 12–18 Stunden nach Interferonzugabe. Interferon- α/β induziert diese Aktivität nicht. In Interferon- γ behandelten Zellen nahm die Konzentration von Tryptophan im Medium stark ab. Die parallel dazu beobachtete Hemmung des Zellwachstums ließ sich in einigen Linien durch wiederholte Zugabe von Tryptophan partiell aufheben. Möglicherweise läßt sich also im Falle des Interferon- γ die komplexe antiproliferative Aktivität teilweise auf vergleichsweise „banale“ Mechanismen wie verstärkte Degradation einer essentiellen Aminosäure zurückführen [82].

Abschließend noch einige Beobachtungen zu morphologischen Veränderungen und Änderungen in der cytoplasmatischen Membran von IFN-behandelten Zellen. Beobachtet wurde eine verstärkte Assoziation von Aktinfilamenten mit der cytoplasmatischen Membran sowie eine erhöhte Tubulin- und Fibronektinproduktion. Die Reorganisation der Aktinfilamente im Bereich der Cytoplasmamembran steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer ebenfalls beobachteten Erhöhung der Membranrigidität und einer damit verbundenen Verringerung der lateralen Diffusion von Proteinkomplexen in der Membran.

Interferone als physiologische Wachstumsinhibitoren [51]

Die Vielzahl der experimentellen Beobachtungen, die hier in einem kleinen Ausschnitt dargestellt wurden, belegt jenseits jedes Zweifels eine intrinsische antiproliferative Aktivität von Interferon. Sie beantwortet jedoch nicht die Frage, ob diese Aktivität eine wünschenswerte und biologisch wichtige Eigenschaft ist oder der Ausfluß eines „überschießenden“ antiviralen Mechanismus. Wäre Wachstumsregulation eine physiologische Eigenschaft von Interferon, so sollte in normalen Zellkulturen, d. h., nicht Virus-infiziert oder andersweitig induziert, Interferon direkt oder indirekt nachweisbar sein. Einige neuere Arbeiten, die einen indirekten Nachweis einer physiologischen Interferonproduktion führen, möchte ich hier anführen.

1. Die Hemmung der PDGF-induzierten Kompetenzgene (c-fos, c-myc u. a.) durch exogen zugeführtes Interferon ist beschrieben worden (s. 2.6.1). In dem gleichen System, d. h., G_1/G_0 -arretierte Balb/c-Fibroblasten, wurde kürzlich gefunden, daß PDGF-Behandlung selbst zu einer Aktivierung des IFN-Systems führt. RNA-Analysen demonstrieren eine Induktion des IFN- β und der 2-5A-Synthetase. Maximale Induktion erfolgte ca. 12 h nach PDGF-Behandlung, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem die Induktion der Kompetenzgene ihr Maximum weit überschritten und die Kultur den G_1 -S-Übergang durchlaufen hatte [94]. Andere Arbeitsgruppen fanden einen Aktivitätspeak der 2-5A-Synthetase in der späten S-Phase.
2. Tumor Nekrose Faktor (TNF) wirkt auf normale menschliche Fibroblasten als Wachstumsfaktor. Behandlung solcher Fibroblastenkulturen mit TNF und einem IFN- β -neutralisierenden Antiserum stimulierte diese mitogene Aktivität erheblich über das hinaus, was mit TNF alleine gefunden wurde. RNA-Analysen demonstrieren die Induktion von 2-5A-Synthetase und IFN- β durch TNF. Die Steigerung der mitogenen Aktivität war bei 1% stärker ausgeprägt als bei 10% Serum. TNF-Behandlung induzierte in den Fibroblasten eine antivirale Aktivität.
3. Letzteres wurde auch für primäre Mausmakrophagen berichtet, die mit „colony stimulating factor 1“ (CSF-1) stimuliert wurden. CSF1 ist ein für Makrophagen spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktor, der ähnlich dem PDGF die Gruppe der Kompetenzgene aktiviert [68, 59].

Aus diesen unabhängig gewonnenen Daten läßt sich eine physiologische Wachstumsregulation durch endogenes Interferon postulieren. Wachstumsfaktoren verschiedenster Zellspezifität würden in ihren Zielzellen primär die „Wachstumsgene“ aktivieren, aber zeitlich verzögert auch im geringen Umfang die Bildung von Interferon induzieren. Diese IFN-Produktion erfolgt zu spät, um im initiierten Zyklus noch eine Hemmung zu bewirken. Das Interferon könnte jedoch durch seine antiproliferative Aktivität die Schwelle für den nächsten G_1 /S-Übergang heraufsetzen, wobei das Ausmaß der resultierenden Proliferationshemmung von dem quantitativen Verhältnis Interferon zu Wachstumsfaktoren bestimmt würde bzw. im Organismus Interferon synergistisch mit weiteren, noch zu beschreibenden Wachstumsinhibitoren wechselwirken könnte.

Interferone und Differenzierung

Das letzte Beispiel einer IFN-Produktion in CSF1-stimulierten Makrophagen ist von weiterem Interesse wegen des möglichen Zusammenhangs von Interferon mit der Differenzierung hämopoetischer Zellen. Interferone, insbesondere Interferon- γ , sind bekannte Makrophagen-aktivierende Faktoren, und diese Aktivierung entspricht funktionell einer Enddifferenzierung. Ein anderes Beispiel ist die Induktion von IFN- β in differenzierenden Friend-Leukämie-Zellen. Diese Zellen lassen sich durch definierte Substanzen, z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO), in Richtung auf Erythrozyten differenzieren. Diese Differenzierung ist verbunden mit einer Wachstums hemmung und u. a. einer Induktion der 2-5A-Synthetase. Beides wird durch ein neutralisierendes Antiserum gegen IFN- β deutlich vermindert [30]. Exogenes Interferon kann die DMSO-induzierte Differenzierung verstärken. Ein ähnlicher Effekt wurde auf der humanen Erythroleukämie-Zelllinie K562 gefunden. Die humanen Leukämie Linien HL-60 und U₉₃₇ lassen sich durch DMSO oder Retinolsäure entlang der Monocytenlinie differenzieren. Auch hier verstärken IFN- α und IFN- β diese induzierte Differenzierung, sind hier jedoch selbst nicht (HL-60) oder nur schwach (U₉₃₇) differenzierend. Interferon- γ allein induziert zu einem gewissen Ausmaß die Differenzierung beider Linien [37, 60].

Diese Ergebnisse zeigen Interferone als Differenzierungsfaktoren bzw. positive Modulatoren von Differenzierungsprozessen, die durch andere Faktoren ausgelöst werden. Interferone können aber auch als negative Modulation einer Differenzierung nicht-hämopoetischer Zellen auftreten. Dies ist u. a. gezeigt worden für die Insulin-induzierte Differenzierung von Maus-3T3-Fibroblasten zu Adipocyten, die durch IFN- α/β und auch durch Tumor Nekrose Faktor hemmbar ist [37]. Ob diese Wirkungen eine „erwünschte“ physiologische Aktivität von Interferon sind, ist derzeit wie bei der antiproliferativen Aktivität noch offen. Indirekt läßt sich jedoch schließen, daß die Anwesenheit von Interferon in frühen Entwicklungsstadien des Embryos „unerwünscht“ ist. Zelllinien aus embryonalen Karzinomen, d. h. aus undifferenzierten Stammzellen, können weder zur Interferonproduktion induziert werden noch induziert exogenes Interferon eine antivirale oder antiproliferative Aktivität in diesen Zellen. Gleiches wurde in Geweben aus frühen Mausembryos gefunden, die mit NDV zur Interferonproduktion induziert wurden. Die Fähigkeit zur Interferonbildung ließ sich frühestens am Tag 8 der Embryogenese nachweisen, primär in dem Trophoblasten und nachfolgend in den anderen embryonalen Geweben mit Ausnahme des embryonalen Ectoderms. Das sich daraus ableitende Embryogewebe erlangte die Fähigkeit zur NDV-induzierten Interferonproduktion am Tag 13 der Entwicklung [3, 11].

Werden undifferenzierte Embryonalzellen in Kultur zur Differenzierung induziert, z. B. durch Behandlung mit Retinolsäure, so erlangen sie innerhalb weniger Tage die Fähigkeit, auf exogenes Interferon eine antivirale Aktivität auszubilden. Biochemische Analysen ergaben, daß undifferenzierte Embryozellen über einen funktionsfähigen Interferonrezeptor verfügen, da die dsRNA-aktivierte Proteinkinase und 2-5A-Synthetase induzierbar waren. Un-

differenzierte Zellen hatten jedoch nur sehr geringe Aktivitäten der 2-5A-abhängigen Nuklease und somit auch nach Induktion der 2-5A-Synthetase durch Interferone und deren Aktivierung durch dsRNA kein funktionsfähiges 2-5A-System. Der Gehalt an Nuklease stieg während der Differenzierung durch Retinolsäure parallel zur Induzierbarkeit der antiviralen Aktivität durch Interferon. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der beschriebenen Rolle des 2-5A-Systems als antiviralen Mechanismus, sollte aber nicht so interpretiert werden, daß die Induzierbarkeit der antiviralen und antiproliferativen Aktivität in differenzierten Embryonalzellen ausschließlich an das 2-5A-System gebunden ist. Neben der 2-5A-abhängigen Nuklease gibt es mit Sicherheit noch weitere intrazelluläre Komponenten, die für eine Interferonantwort essentiell sind und deren Expression differenzierungsabhängig reguliert wird [52].

Auch Zelllinien aus humanen Embryonalkarzinomen sind hinsichtlich des Interferonsystems analysiert worden und die publizierten Ergebnisse sind analog zu denen mit mäuseichen Zelllinien, d. h. diese Zellen hatten weder die Fähigkeit zur Interferonproduktion noch zur Antwort auf exogenes Interferon [76].

In Primärkulturen von Hamsterembryonen wurde nach Induktion mit NDV ein Interferontyp gefunden, welcher sich biochemisch und funktionell von dem „adulten“ Interferon unterscheiden ließ. Dieses „embryonale“ Interferon hatte eine antivirale und antiproliferative Aktivität wie der „adulte“ Typ, hemmt aber im Gegensatz zu letzterem nicht die Adipozytendifferenzierung. Möglicherweise gibt es also entwicklungspezifische Interferone, die in ihren Eigenschaften von den bekannten Interferontypen abweichen und daher mit den besonderen Bedingungen der frühen Embryogenese kompatibel sind [34].

Die antitumorale Aktivität im Tiermodell [2, 36]

Für diese komplexe biologische Aktivität von Interferonen sollen abschließend Beispiele für eine antitumoralen Wirkung in Tiermodellen beschrieben werden. Das Versuchstier ist in allen Fällen die Maus, die vorgestellten Tumore sind viralen Ursprungs, es ist in diesen Modellen jedoch ausgeschlossen, daß die antitumorale Aktivität primär eine antivirale Wirkung des Interferon ist.

Tumore von Adenovirus-transformierten Zellen

Humane Adenoviren transformieren nicht-permissive Nagerzellen in Kulturen und verursachen Tumore bei Mäusen, Ratten, Hamstern etc. Transformation von Zellen in Kultur ist eine allgemeine Eigenschaft dieser Adenoviren, die transformierten Zellen zeigen aber erhebliche Unterschiede in ihrer Tumorigenität in der syngen Maus und zwar abhängig vom Adenovirus Sub-

typ, der zur Transformation eingesetzt wurde. Adenovirus 5-transformierte Zellen sind z. B. wenig tumorigen, während Adenovirus 12-transformierte Zellen nach Injektion in die Maus zu Tumoren auswachsen. Ein entsprechendes Ergebnis erhält man bei Infektion von Nagern mit den entsprechenden Adenoviren. Die virale Funktion, die für Transformation/Tumorigenität essentiell ist wurde identifiziert, es sind die Produkte der frühen E1A- und E1B-Gene.

Die Transformation von Mauszellen durch Adenovirus 12 reduziert die Expression der MHC Klasse 1-Antigene (H-2K, -D, -L), die Hemmung der Expression der H-2 „heavy chain“ ist auf mRNA-Ebene nachweisbar. Die Expression des β_2 -Mikroglobulins wird nicht gehemmt. Der nicht-tumorigene Adenovirus 5 bewirkt nach Transformation keine Repression der H-2-Expression. Da MHC Klasse 1-Antigene essentiell für die Erkennung Virus-transformierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphocyten sind, beruht die Tumorigenität von Adenovirus 12 wahrscheinlich darauf, daß durch ihn transformierte Zellen wegen der fehlenden H-2-Antigene der zellulären Immunität im Organismus entgehen.

Interferone aller drei Typen stimulieren die Expression von MHC Klasse 1-Antigenen. Adenovirus 12-transformierte Mauszellen wurden mit IFN- α/β oder IFN- γ behandelt und in Tiere injiziert. Die Tumorigenität wurde mit der von unbehandelten, transformierten Zellen verglichen. Interferonbehandlung vor Injektion verstärkte die H-2-Expression und erniedrigte Tumorwachstum im Organismus und erhöhte die Überlebensrate der Tiere. Das gleiche wurde beobachtet, wenn unbehandelte, transformierte Zellen injiziert und die Tiere nachfolgend mit Interferon behandelt wurden; nach initialem Tumorwachstum wurde später eine z. T. vollständige Remission beobachtet.

Die Ergebnisse werden dahingehend diskutiert, daß durch IFN-stimulierte MHC-Expression die Adenovirus 12-transformierten Zellen sensitiv für zytotoxische T-Lymphocyten werden und dadurch ihr tumorigenes Potential verlieren, obwohl im Falle der Behandlung von Tieren mit Interferon auch andere antitumorale Mechanismen, wie z. B. die Aktivierung von Makrophagen in Betracht kommen könnte [40] (Abb. 4).

Das „Friend Erythroleukämiezellen“ Modell

Die Friend-Leukämiezellen (FLZ) sind Vorläufer der roten Blutzellen der Maus. Sie sind chronisch infiziert mit einem Retrovirus (Friend Leukemia Virus) und bilden in syngeneten Mäusen Tumore, die je nach Injektion (i. p., s. c.) als Aszites oder solide Tumore auswachsen. Normale FLZ sprechen in Kultur auf Interferon an, d. h., Interferone bewirken sowohl eine antivirale Aktivität gegen infizierendes Virus wie auch eine Wachstumshemmung. Es wurden IFN- α/β -resistente Sublinien von FLZ isoliert, die zwar noch einen IFN-Rezeptor besitzen, jedoch nach einer Reihe von Kriterien nicht auf Interferon reagieren, z. B. sie waren nicht antiviral, nicht Wachstums-gehemmt, es wurde keine Induktion der 2-5A-Synthetase oder Stimulation der MHC

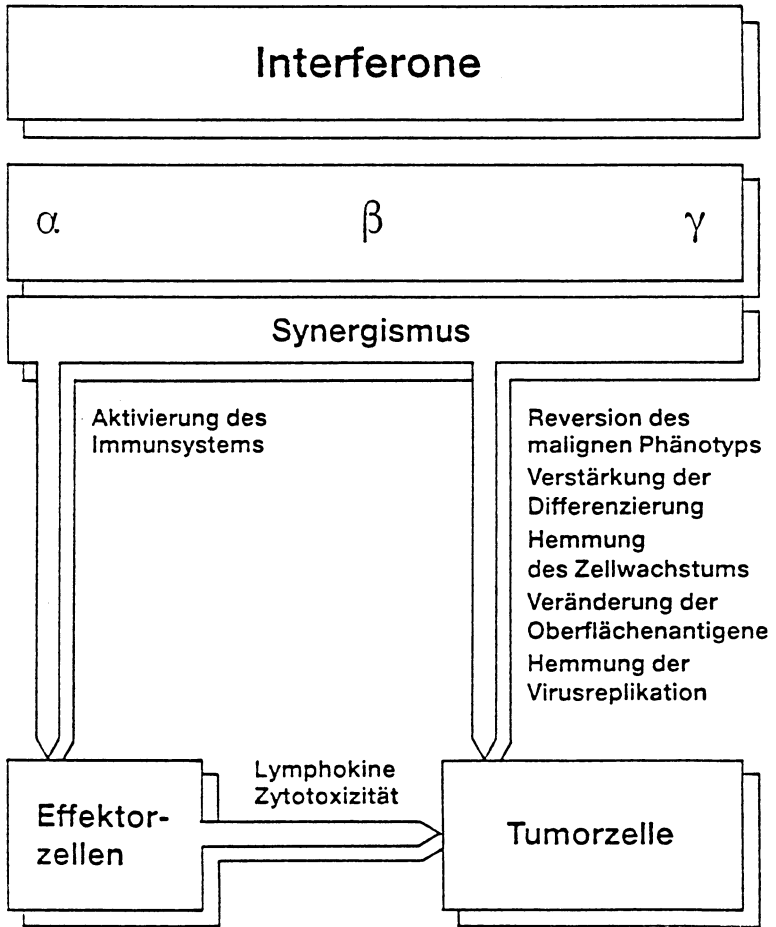


Abb. 4. Mögliche Mechanismen der Hemmung von Tumoren durch Interferon

Klasse 1-Expression nach IFN- α/β -Behandlung beobachtet. Der molekulare Defekt in der Interferonantwort ist nicht definiert worden.

Interferon-sensitiver FLZ und der -resistente Subklon wurden in einem Maus-Tumormodell verglichen hinsichtlich der Wirkung von IFN-Therapie auf Tumorwachstum und Überlebensrate. Wiederholte Behandlung mit IFN- α/β nach Injektion der Tumorzellen führte zu einer dramatischen (ca. 100fach) Abnahme der FLZ im Peritoneum innerhalb von zwei bis vier Tagen. Die Behandlung mit Interferon vor Injektion von Tumorzellen war weit weniger wirksam. Bei subkutanen Tumoren war lokale Injektion von Interferon wirkungsvoller als i.p. Applikation. Sowohl hinsichtlich der Reduktion der Tumorzellen im Peritoneum wie auch hinsichtlich der Überlebensrate wurden zwischen IFN-sensitiven und -resistenten FLZ keine Unterschiede gemessen. Der resistente Phänotyp war stabil bei wiederholter Passage im

Tier, d.h., es erfolgte im Organismus keine Selektion auf den IFN-sensitiven Phänotyp.

Ein qualitativ gleiches Ergebnis erhielt man, wenn statt der FLZ die Lymphomlinie L₁₂₁₀ verwendet wurde. Hiervon gibt es eine Sublinie, die keinen Rezeptor für IFN- α/β exprimiert und infolgedessen auf Interferon nicht reagiert. Der resistente Subklon und die sensitive Ausgangslinie wurden in einem i. p. Modell gleichermaßen durch Interferon gehemmt.

Es stellt sich natürlich die Frage nach dem Mechanismus der antitumoralen Aktivität. Die gleiche Sensitivität normaler und resistenter Zellen auf IFN im Tier sprechen eindeutig gegen eine direkte zytostatische oder zytotoxische Wirkung. Zytotoxische T-Lymphozyten oder Makrophagen als Basis der antitumoralen Wirkung sind wenig wahrscheinlich, da weder Bestrahlung der Mäuse noch Behandlung mit einem anti-Lymphozytenserum oder Silika-Partikeln die Wirkung aufgehoben und FLZ außerdem schlechte „targets“ für NK-Zellen sind. Desgleichen sprechen „adoptive transfer“ Experimente gegen eine Zell-vermittelte Zytotoxizität noch ließ sich in der Peritonealflüssigkeit nach IFN-Behandlung ein extrazellulärer zytotoxischer Faktor nachweisen. Lokale Applikation von Interferonen bei subkutanen Tumoren führten zu einer Nekrose, ohne daß eine Infiltration mit Leukozyten erfolgte. Obwohl die antitumorale Wirkung in diesem Modell eindeutig indirekter Natur ist, läßt sie sich durch keines der gängigen Erklärungsschemata erfassen und bislang nicht erkannte Aktivitäten von Interferon, die eventuell erst in Kombination mit weiteren Cytokinen auftreten, müssen hier postuliert werden [35].

Zusammenfassung

Dieses Kapitel ist der Versuch, einen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Interferonforschung zu geben, als Grundlage für nachfolgende Kapitel, in denen spezifischere Fragestellungen abgehandelt werden. Beschrieben wurden einerseits die Interferone „per se“, d. h., die Biochemie und Molekularbiologie ihrer Struktur und Induktion und andererseits zwei ihrer wesentlichen biologischen Aktivitäten – die antivirale und die antiproliferative Wirkung. Sowohl die Breite dieses Forschungsgebietes wie auch der z. T. noch sehr fragmentarische Kenntnisstand machen eine inhaltliche Zusammenfassung dieses Kapitels schwierig. Stattdessen möchte ich versuchen, einige Fragestellungen für zukünftige Grundlagenforschung in diesen verschiedenen Gebieten zu entwickeln.

Die Beschreibung der Interferone „per se“ ist am weitesten fortgeschritten, so daß hier wohl wenig grundlegend neue Erkenntnisse zu erwarten sind. Hiervon ausgenommen ist die Beschreibung der drei-dimensionalen Struktur der Interferone. Sehr viel unklarer ist allerdings der Wissensstand betreff der IFN-Induktion. Hier hat sich unser Verständnis von der Molekularbiologie des Induktionsvorgangs auf Ebene der DNA in den letzten Jahren wesentlich erweitert, es fehlt allerdings noch vollständig die Verbindung zwischen den biologischen Induzenten, z. B. Virus, dsRNA, LPS, und der eigentlichen Gen-

regulation. Hierin beinhaltet ist die Frage nach der differentiellen Induktion von IFN- α und IFN- β bzw. den verschiedenen IFN- α -Subtypen, die sowohl vom Induzenten wie vom Zelltyp bestimmt wird wie auch die Frage nach den IFN-produzierenden Geweben *in vivo*.

Die Beschreibung der IFN-Rezeptoren ist zu diesem Zeitpunkt noch unvollständig und der Weg der Signalübertragung vom Rezeptor zum Zellkern ist unbekannt. Eine Anzahl IFN-induzierter Gene sind identifiziert worden und die Untersuchungen zum Mechanismus ihrer Induktion auf DNA-Ebene haben erhebliche Fortschritte gemacht. Bei der Mehrzahl der IFN-induzierten Gene muß allerdings die physiologische Bedeutung des entsprechenden Proteins für die IFN-Wirkung noch aufgeklärt werden.

Hinsichtlich der biologischen Aktivitäten von Interferon darf man wohl annehmen, daß die wesentlichen Aktivitätskomplexe, d.h. antiviral, antiproliferativ, immunregulatorisch, auf der Ebene ihrer Biologie erfaßt sind. Sehr fragmentarisch ist jedoch das Wissen von den Mechanismen dieser Aktivitäten und im Falle der antiproliferativen und differenzierungsmodulierenden Aktivität muß die Frage der physiologischen Bedeutung noch beantwortet werden. Mit der Aufklärung der dsRNA-aktivierten Translationskontrolle (2-5A-System, Proteinkinase-Pathway) ist ein antiviraler Mechanismus molekular charakterisiert worden. Gleichzeitig hat man jedoch erkannt, daß auch die antivirale Aktivität der Zelle eine Anzahl weiterer Mechanismen umfassen muß, deren Wirkungsweisen noch kaum verstanden sind; und mit einer ziemlichen Wahrscheinlichkeit sind gerade die Wirkungen von Interferon gegen klinisch relevante Viren, z. B. HSV, HBV, HPV, HIV, von den dsRNA-aktivierten Mechanismen unabhängig. Auch die Frage der relativen Bedeutung der direkten, zellulären antiviralen Aktivität im Gegensatz zu der indirekten, immunregulatorischen Aktivität bedarf der Aufklärung, da sie von Bedeutung für die therapeutische Anwendung der Interferone sein sollte.

Hinsichtlich der antiproliferativen Aktivität von Interferon sind einzelne, u. U. relevante Einzelbeobachtungen gemacht worden und das Fehlen eines Gesamtkonzepts ist wohl eher eine Reflektion des begrenzten Wissenstandes auf dem Gebiet der Zellwachstumskontrolle an sich. Von großem Interesse sind die Beobachtungen zur IFN-Induktion durch Wachstumsfaktoren, die der bislang konkreteste Hinweis auf eine Rolle von Interferon als endogene Wachstumsinhibitoren sind. Was zur Unterstützung dieser Hypothese allerdings noch fehlt sind experimentelle Belege für eine entsprechende IFN-Produktion *in vivo* in proliferierenden Geweben.

Abschließend sei noch ein Fragenkomplex erwähnt, der in diesem Kapitel nur kurz angesprochen wurde, aber mit Sicherheit in Zukunft größeres Interesse erfahren wird; die Wechselwirkung von Interferon mit anderen Cytokinen. Experimentell nachgewiesen sind synergistische Beziehungen zwischen IFN- α/β und IFN- γ einerseits und der Interferone mit Tumor Nekrose Faktor andererseits. Diese Synergismen wurden für alle wesentlichen Aktivitätsbereiche gefunden. Da diese Cytokine *in vivo* unter den gleichen Bedingungen (z. B. Virusinfektion), gebildet werden können, sollten diese Wechselwirkungen eine physiologische und ggf. auch therapeutische Relevanz haben.

Literatur

1. Baglioni C, Benedetti A, Williams G (1984) Cleavage of Nascent Reovirus mRNA by Localized Activation of the 2', 5'-Oligoadenylate-Dependent Endoribonuclease. *J Virol* 52:865-871
2. Balkwill FR (1985) Antitumour effects of interferons in animals. In: Finter NB, Oldham RK (eds) *Interferon: In vivo and clinical studies*. Elsevier Science Publishers, pp 23-45
3. Barlow DP, Randle BJ, Burke DC (1984) Interferon synthesis in the early post-implantation mouse embryo. *Differentiation* 27:229-235
4. Belardelli F, Vignaux F, Proietti E, Gresser I (1984) Injection of mice with antibody to interferon renders peritoneal macrophages permissive for vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Proc Natl Acad Sci* 81:602-606
5. Belkowski CS, Sen GC (1987) Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J Virol* 61:653-660
6. Benedetti A, Baglioni C (1984) Inhibition of mRNA binding to ribosomes by localized activation of dsRNA-dependent protein kinase. *Nature* 311:79-81
7. Benedetti A, Williams G, Comeau L, Baglioni C (1985) Inhibition of Viral mRNA Translation in Interferon-Treated L Cells Infected with Reovirus. *J Virol* 55:588-593
8. Besancon F, Silbermann F, Dron M, Tovey M, Thang MN, Bourgeade MF (1987) Relationship between Inhibition of Cell Growth and of Transferrin Receptor Expression by Interferon (IFN) Alpha: Studies in IFN-sensitive and IFN-resistant Daudi Cells. *J. gen Virol* 68:2647-2654
9. Brennan M, Stark G (1983) Interferon Pretreatment Inhibits Simian Virus 40 Infections by Blocking the Onset of Early Transcription. *Cell* 33:811-816
10. Bukowski J, Welsh R (1985) Interferon Enhances the Susceptibility of Virusinfected Fibroblasts to Cytotoxic T Cells. *J Exp Med* 161:257-262
11. Burke DC (1986) Interferon and cell differentiation. *Br. J. Cancer* 53:301-306
12. Burke DC, Shuttleworth J (1984) The control of interferon-alpha and interferon β gene expression. In: Friedman R (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers pp 85-111
13. Chatterjee S, Hunter E, Whitley R (1985) Effect of cloned human interferons on protein synthesis and morphogenesis of herpes simplex virus. *J Virol* 56:419-425
14. Chebath J, Benesh P, Hovanessian A, Galabru J, Revel M (1987) Four Different Forms of Interferon-induced 2', 5'-Oligo (A) Synthetase Identified by Immunoblotting in Human Cells. *J Biochem* 262:3852-3857
15. Chebath J, Benesh P, Hovanessian, Galabru J, Revel M (1987) Four Different Forms of Interferon-induced 2', 5'-Oligo (A) Synthetase Identified by Immunoblotting in Human Cells. *J Biol Chem* 262:3852-3857
16. Cayley PJ, Davies JA, McCullagh KG, Kerr I (1984) Inactivation of the ppp (A2'p)nA system and its prevention by interferon. *Biochem Biophys Res Commun* 140:165
17. Clemens MJ, McNurlan MA (1985) Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. *J. Biochem* 226:345-360
18. Collins J (1984) Interferon genes: gene structure and elements involved in gene regulation. In: Friedman R (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers, pp 33-83
19. Czarniecki C, Fennie C, Powers D, Estell D (1984) Synergistic Antiviral and Antiproliferative Activities of Eschericia coli-Derived Human Alpha, Beta, and Gamma Interferons. *J. Virol* 49:490-496
20. Dinter H, Hauser H (1987) Superinduction of the human interferon- β promotor. *EMBO J.* 6:599-604
21. Domke I, Straub P, Jacobsen H, Kirchner H, Panet A (1985) Inhibition of replication of herpes simplex virus in mouse macrophages by interferons. *J Gen Virol* 66:2231-2236
22. Domke I, Straub P, Kirchner H (1986) Effect of interferon on replication of herpes simplex virus type 1 and 2 in human macrophages. *J Virol* 60:37-42

23. Einat M, Resnitzky D, Kimchi A (1985) Close links between reduction of c-myc expression by interferon and G0/G1 arrest. *Nature* 313:597-531
24. Einat M, Resnitzky D, Kimchi A (1985) Inhibitory effects of interferon on the expression of genes regulated by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 82:7608-7612
25. Etienne-Smekens M, Vandenbusche P, Content J & Dumont JE (1983a) (2-5')oligoadenylate in rat liver; Modulation after partial hepatectomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4609-4613
26. Feduchi E, Carrasco L (1987) Adenovirus infection reverses the antiviral state induced by human interferon. *FEBS Letters* 214:153-157
27. Friedman R (1977) Antiviral Activity of Interferons. *Bacteriol Rev* 41:543-567
28. Friedman R, Manly S, McMahon M, Kerr I, Stark G (1984) Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Interferon-Induced Gene Expression in Human Cells. *Cell* 38:745-755
29. Friedman R, Pitha P (1984) The effect of interferon on membrane-associated viruses. In: Friedman RM (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers, pp 319-341
30. Friedman-Einat M, Revel M, Kimichi A (1982) Initial characterization of a spontaneous secreted interferon during growth and differentiation of Friend Erythroleukemia Cells. *Mol Cell Biol* 2:1472-1480
31. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H (1987) Interferon β /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84:7251-7255
32. Goodbourn S, Maniatis T (1988) Overlapping positive and negative regulatory domains of the human β -interferon gene. *Proc Natl Acad Sci* 85:1447-1451
33. Gray PW, Goeddel DV (1982) Structure of the immune interferon gene. *Nature* 298:859
34. Greene JJ, Ts'O P (1986) Preferential Modulation of Embryonic Cell Proliferation and Differentiation by Embryonic Interferon. *Exp Cell Res* 167:400-406
35. Gresser I (1984) Role of interferon in resistance to viral infections in vivo. In: Vilcek J, De Maeyer E (eds) *Interferon: Interferons and the immune system*. Elsevier Science Publishers, pp 221-247
36. Gresser I (1985) *How does Interferon Inhibit Tumor Growth?* Academic Press, London
37. Grossberg S, Taylor J (1984) Interferon effects on cell differentiation. In: Friedman RM (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers, pp 299-317
38. Haller O (1981) Inborn resistance to orthomyxoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 92:24-52
39. Haller O, Arnheiter H, Lindemann J, Gresser I (1980) Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. *Nature* 283:660-662
40. Hayashi H, Tanaka K, Jay F, Khoury G, Jay G (1985) Modulation of the Tumorigenicity of Human Adenovirus-12-Transformed Cells by Interferon. *Cell* 43:263-267
41. Hearl W, Johnston M (1987) Accumulation of 2', 5'-Oligoadenylates in Encephalomyocarditis Virus-Infected Mice. *J Virol* 61:1586-1592
42. Hersh C, Brown R, Roberts W, Swyryd E, Kerr, Stark G (1984) Simian virus 40-infected, Interferon-treated Cells Contain 2', 5'-Oligoadenylates Which Do Not Activate Cleavage of RNA. *J Biol Chem* 259:1731-1737
43. Heyns A, Eldor A, Vlodaysky I, Kaiser N, Friedman R, Panet A (1985) The antiproliferative Effect of Interferon and the Mitogenic Activity of Growth Factors Are Independent Cell Cycle Events. *Exp Cell Res* 161:297-306
44. Hilfenhaus J, Polastri GD (1985) Antiviral effects of interferons in animals. In: Finter, NB, Oldham RK (eds) *Interferon: In Vivo and clinical studies*. Elsevier Science Publishers, pp 1-21

45. Issacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference 1. The interferon. *Proc R Soc B* 147, 258
46. Jacobsen H (1986) Interferons and antiviral activity. *Drug Rs* 36:512-516
47. Johnston M, Torrence P (1984) The role of interferon-induced proteins, double-stranded RNA and 2', 5'-oligoadenylate in the interferon-mediated inhibition of viral translation. In: Friedman, RM (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers, pp 190-297
48. Jonak GJ, Knight E (1984) Selective reduction of c-myc mRNA in Daudi cells by human β interferon. *Proc Natl Acad Sci* 81:1747-1750
49. Katze M, DeCorato D, Safer B, Galabru J, Hovanessian A (1987) Adenovirus VAI RNA complexes with the 68000 M_r protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity. *EMBO J* 6:689-697
50. Keller AD, Maniatis T (1988) Identification of an inducible factor that binds to a positive regulatory element of the human β -interferon gene. *Proc Natl Acad Sci* 85:3309-3313
51. Kimchi A (1987) Autocrine interferon and the suppression of the c-myc nuclear oncogene. *Interferon* 8:85-110
52. Krause D, Silverman RH, Jacobsen H, Leisy SA, Dieffenbach CW & Friedman RM (1985b) Regulation of ppp(A2'p)nA-dependent RNase levels during interferon treatment and cell differentiation. *Eur J Biochem.* 611-615
53. Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O (1985) Inhibition of influenza virus mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx Gene product. *J. Virol.* 50:201-206
54. Langer J, Pestka S (1985) Structure of Interferons. *Pharmac Terh* 27:371-401
55. Lundblad D, Lundgren E (1981) Block of a Glioma Cell Line in S by Interferon (1981) *Int J. Cancer* 27:749-754
56. Maheshwari R, Husain M, Friedman R (1983) Low Infectivity of Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Particles Released from Interferon-Treated Cells is Related to Glycoprotein Deficiency. *Biochem Biophys Res Com* 117:161-168
57. Mark D, Lu SD, Creasey A, Yamamoto R, Lin LS (1984) Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad Sci* 81:3662-3666
58. Mittnacht S, Straub P, Kirchner H, Jacobsen H (1988) Interferon Treatment Inhibits Onset of Herpes Simplex Virus Immediate- Early Transcription. *Virology* 164:201-210
59. Moore RN, Larsen HL, Horhov PW, Rouse BT (1984) Endogenous regulation of macrophage proliferative expansion by colony-stimulating factor-induced interferon. *Science* 223:178-181
60. Moritz T, Kirchner H (1986) The Effect of Interferons on Cellular Differentiation. *Blut* 53:361-370
61. Nilsen TW, Baglioni C (1979) Mechanism for discrimination between viral and host mRNA in interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2600-2604
62. Ohlsson M, Feder J, Cavalli-Sforza LL, von Gabain A (1985) Close linkage of alpha and β interferons and infrequent duplication of β interferon in humans. *Proc Natl Acad Sci* 82:4473-4476
63. Ortaldo J, Herberman R, Harvey C, Osheroff P, Yu-Ching E, Kelder B, Pestka S (1984) A species of human alpha interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci* 81:4926-4929
64. Otto B (1985) Recombinant Human Interferons. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 35:1750-1752
65. Pfeffer L, Donners D, Tamm I (1987) Interferon-Alpha Down-regulates Insulin Receptors in Lymphoblastoid (Daudi) Cells. *J of Biol Chem* Vol 262:3655-3670
66. Proietti E, Gessani S, Belardelli F, Gresser I (1986) Mouse Peritoneal Cells Confer an Antiviral State on Mouse Cell Monolayers: Role of Interferon. *J Virol* 57:456-463
67. Rehberg E, Kelder B, Hoal E, Pestka S (1982) Specific Molecular Activities of Recombinant and Hybrid Leukocyte Interferons. *J Biol Chem* 257:11497-11502
68. Resnitzky D, Yarden A, Zipori D, Kimchi A (1986) Autocrine β -Related Interferon Con-

- trols c-myc Suppression and Growth Arrest during Hematopoietic Cell Differentiation. *Cell* 46:31-40
69. Revel M, Chebath J (1986) Interferon-activated genes. *TIBS* 11:166-170
 70. Rice A, Kerr I (1984) Interferon-Mediated, Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase is Inhibited in Extracts from Vaccinia Virus-Infected Cells. *J Virol* 50:229-236
 71. Rice A, Roberts W, Kerr I (1984) 2-5A Accumulates to High Levels in Interferon-Treated, Vaccinia Virus-Infected Cells in the Absence of Any Inhibition of Virus Replication. *J Virol* 50:220-228
 72. Richard L, Panniers V, Clemens M (1981) Inhibition of Cell Division by Interferon: Changes in Cell Cycle Characteristics and in Morphology of Ehrlich Ascites Tumor Cells in Culture. *J Cell Sci* 48:259-279
 73. Schellekens H, Smiers-de Vreede E, de Reus A, Dijkema R (1984) Antiviral Activity of Interferon in Rats and the Effect of Immune Suppression. *J. Gen Virol* 65:391-396
 74. Schellekens H, Weimar W, Cantell K, Stitz L (1979) Antiviral effect of interferon in vivo may be mediated by the host. *Nature* 278:742
 75. Sehgal PB, Pfeffer LM, Tamm I (1982) Interferon and Its Inducers In: Carme PE, Calicuin LA (eds) *Viral Infect*, pp 205-311.
 76. Sekiya S, Tomita Y, Chen H-Y, Kawata M, Oosaki T, Kuwata T, Takamizawa H (1987) Sensitivity of human germ-cell-tumor cell lines to human interferons. *Differentiation* 33:266-269
 77. Sen G (1984) Biochemical Pathways in Interferon-Action. *Pharmac Ther* 24:235-257
 78. Shiroki K, Toth M (1988) Activation of the Human Beta Interferon Gene by the Adenovirus Type 12 E1B Gene. *J. Virol* 62:325-330
 79. Sreevalsan T (1984) Effects of interferons on cell physiology. In: Friedman RM (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers, pp 343-387
 80. Staeheli P, Haller O, Boll W, Lindenmann J, Weissmann C (1986) Mx Protein: Constitutive Expression in 3T3 Cells Transformed with Cloned Mx cDNA Confers Selective Resistance to Influenza Virus. *Cell* 44:147-158
 81. Straub P, Domke I, Kirchner H, Jacobsen H, Panet A (1986) Synthesis of herpes simplex virus proteins and nucleic acids in interferon-treated macrophages. *Virol* 150:411-418
 82. Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R (1988) Mechanism of Interferon-Gamma Action. *J Biol Chem* 4:2041-2048
 83. Taylor-Papadimitriou J (1984) Effects of interferons on cell growth and function. In: Billiau A (ed) *Interferon: General and applied aspects*. Elsevier Science Publishers, pp 139-165
 84. Twu JS, Lee CH, Lin PM, Schloemer RH (1988) Hepatitis B virus suppresses expression of human β -interferon. *Proc Natl Acad Sci* 85:252-256
 85. Vilcek J (1984) Interferon production and its regulation. In: Friedman (ed) *Interferon: Mechanisms of production and action*. Elsevier Science Publishers, pp 1-10
 86. Vilcek J, Kelker H, Le J, Yip YK (1985) Structure and Function of Human Interferon-Gamma. In: Ford R, Maizel A (eds) *Mediators in Cell Growth and Differentiation*. Raven Press, New York, pp 299-313
 87. Weber H, Valenzuela D, Lubjber G, Gubler M, Weissmann C (1987) Single amino acid changes that render human IFN-alpha 2 biologically active on mouse cells. *EMBO J* 6:591-598
 88. Whitaker-Dowling P, Youngner J (1983) Vaccinia Rescue of VSV from Interferon-Induced Resistance: Reversal of Translation Block and Inhibition of Protein Kinase Activity. *Virology* 131:128-136
 89. Wussow v P, Jakschies D, Hochkeppel HK, Fibich C, Penner L, Deicher H (1990) The human intracellular Mx-homologous protein is specifically induced by type-I-Interferons. *Eur J Immun* (in press)
 90. Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kisimoto T (1987) Structure and expression of human β cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* 6:2939-2945

91. Zawatzky R, Gresser I, DeMaeyer E, Kirchner H (1982) Role of IFN in the resistance of C57BL/6 mice to different doses of HSV type 1. *J Infect Dis* 146:405-410
92. Zilberstein A, Rugeiri R, Korn JH, Revel M (1986) Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* 5:2529-2537
93. Zoon K, Arnheiter H (1984) Studies of the Interferon Receptors. *Pharmac Ther* 24:259-278
94. Zullo J, Cochran B, Huang A, Stiles C (1985) Platelet-Derived Growth Factor and Double Stranded Ribonucleic Acids Stimulate Expression of the Same Genes in 3T3 Cells. *Cell* 43:793-800