

# ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

82. JAHRGANG 1970  
HEFT 13  
SEITE 489--526

## Interferon

Von Y. K. S. Murthy und Hans-Peter Anders<sup>[\*]</sup>

*Interferone sind Proteine, die in Vertebraten eine unspezifische, nicht-immunologische Abwehrreaktion gegen Virusinfektionen hervorrufen. Die Bildung von Interferon wird in vivo und in vitro durch Viren und andere Agentien, z.B. Endotoxin, Nucleinsäuren, synthetische anionische Copolymeren und Phytohämagglutinin, induziert. Es ist bisher nicht gelungen, reines Interferon darzustellen. Seine antivirale Wirkung kann sich nur entfalten, wenn die zelluläre RNA- und Proteinsynthese intakt ist.*

### 1. Einleitung

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß die Bildung von Antikörpern nicht die einzige Möglichkeit des Wirtsorganismus zur Abwehr einer Virusinfektion ist. Eine dieser nicht-immunologischen Abwehrmöglichkeiten ist die „virale Interferenz“, d.h. der Effekt, daß sich mehrere Virusarten bei der Vermehrung im gleichen Wirt gegenseitig beeinflussen können.

Findlay und MacCallum<sup>[1]</sup> zeigten 1937, daß Affen durch eine Behandlung mit „Rift valley fever“-Virus vor einer Infektion mit dem immunologisch nicht verwandten Gelbfieber-Virus geschützt wurden. Ørskov und Andersen<sup>[2]</sup> beobachteten kurz nach der Infektion von Kaninchenhaut mit Vaccinia-Virus das Auftreten eines „lokalen“ Antikörpers, als im Serum noch keine Antikörper nachgewiesen werden konnten. 1962 diskutierten die Autoren diese Beobachtung als einen möglichen Interferon-Effekt. Lenette und Koprowski<sup>[3]</sup> konnten eine schwache antivirale Wirkung in infizierten Hühner- und Mäuseembryokulturen feststellen, auch nachdem die Viren abgetrennt waren. Matumoto et al.<sup>[4]</sup> zeigten, daß Mäuse nach der Infek-

tion mit einem neurotropen „Rift valley fever“-Virus vor einer virulenten pantropen Variante des gleichen Virus geschützt waren. (Übersichten über „virale Interferenz“ s. [5–7].)

1957 gelang es Isaacs und Lindenmann<sup>[8]</sup>, ein Wirkungsprinzip der viralen Interferenz eindeutig von dem der spezifischen Immunität zu unterscheiden. Sie behandelten die Chorioallantois-Membran von Hühnerembryonen mit inaktivierten, also nicht vermehrungsfähigen Influenza-Viren. Nach drei Stunden bei 37 °C wurden die Membranstücke mit dem adsorbier-ten Virus in eine Pufferlösung gegeben und 24 Stunden inkubiert. In der Pufferlösung wurde nach Abtrennung des Gewebes eine antiviral wirksame Substanz gefunden, welche die Autoren „Interferon“ nannten. In der Folgezeit wurde festgestellt, daß Interferon oder ähnliche Substanzen in den Zellen vieler Vertebraten als Antwort auf eine Virusinfektion gebildet werden.

Die Wirksamkeit dieser Interferone erstreckt sich auch auf Bedsonien, Bakterien, Protozoen und einige onkogene Viren, z.B. Leukämie-Viren<sup>[9, 10]</sup>. Es gilt heute als sicher, daß Interferon eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung einer unspezifischen Resistenz eines Wirtsorganismus gegenüber einer Superinfektion mit einem zweiten Virus spielt. Es ist schwierig, nachträglich festzustellen, ob die vor Kenntnis des Interferons beschriebenen Effekte der viralen Interferenz auf der

[\*] Dr. Y. K. S. Murthy und Dr. H.-P. Anders  
Schering AG, Hauplaboratorium  
1 Berlin 65, Müllerstraße 170–172

[1] G. M. Findlay u. F. O. MacCallum, J. Pathol. Bacteriol. 44, 405 (1937).

[2] J. Ørskov u. E. K. Andersen, Acta pathol. microbiol. scand., Suppl. 37, 621 (1938).

[3] E. H. Lenette u. H. Koprowski, J. exp. Medicine 83, 195 (1946).

[4] M. Matumoto, I. Nishi u. Y. Saburi, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 153, 1645 (1959).

[5] W. Henle, J. Immunology 64, 203 (1950).

[6] R. W. Schlesinger in T. M. Rivers u. F. C. Horsfall: Viral and Rickettsial Infections of Man. Pitman Publ., London 1959, S. 145 ff.

[7] R. Wagner, Bacteriol. Reviews 24, 151 (1960).

[8] A. Isaacs u. J. Lindenmann, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 147, 258 (1957).

[9] T. C. Merigan, Symposium über Interferon, Lyon 1969.

[10] E. F. Wheelock, Symposium über Interferon, Lyon 1969.

Wirkung von Interferon beruhen oder andere Ursachen haben. Sicher ist nur, daß es außer dem Interferonsystem noch andere Arten der viralen Interferenz gibt<sup>[11-14]</sup> (zum derzeitigen Stand der Interferonforschung s. auch<sup>[15-20]</sup>).

## 2. Biologische Eigenschaften

Eine der interessantesten Eigenschaften des Interferons ist die Unspezifität seiner antiviralen Wirkung. Interferon verleiht der Wirtszelle Resistenz sowohl gegenüber RNA- als auch gegenüber DNA-Viren, einschließlich einiger onkogener Viren. Darüber hinaus erstreckt sich das Wirkungsspektrum auch auf Bakterien, Bedsonien und Protozoen. Es gibt aber beträchtliche Unterschiede in der Empfindlichkeit der Virusstämme gegenüber Interferon. Ruiz-Gomez und Isaacs<sup>[21]</sup> konnten zeigen, daß auf Hühnerembryofibroblasten die 30-fache Interferonmenge benötigt wird, um „Newcastle Disease“-Virus (NDV)<sup>[\*]</sup> in gleichem Maße zu hemmen wie „O'nyong-nyong“-Virus. Auch andere Autoren beschrieben Unterschiede in der Empfindlichkeit der Viren gegenüber Interferon<sup>[22-24]</sup>. Solche Unterschiede sind offenbar auch von der Art der Wirtszelle abhängig. Zwei Stämme von Vesicular-stomatitis-Virus (VSV), die in L-Zellen (stabilisierte Zell-Linie von Mäusefibroblasten) von Interferon in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt werden, zeigen in Hühnerembryozellen die gleiche Empfindlichkeit<sup>[25]</sup>.

Es ist sehr schwierig, aufgrund der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse eine Übersicht über die Empfindlichkeit der Viren gegenüber Interferon zu geben. Die Arbor-Viren gehören zu den empfindlichsten, während Newcastle-, Herpes-, Adeno- und Pseudorabies-Viren relativ resistent erscheinen. Von mittlerer

Empfindlichkeit ist VSV. Die meisten Befunde sprechen dafür, daß die Interferon-Empfindlichkeit und das Interferon-Induktionsvermögen etwa parallel verlaufen. Interessant ist die Ansicht, daß die Virulenz von Virusstämmen eng mit der Interferon-Empfindlichkeit und -Induktionsfähigkeit zusammenhängt<sup>[26, 27]</sup>. Bei virulenten Stämmen ist das Interferonsystem weniger wirksam als bei avirulenten Stämmen.

Ein weiteres wichtiges biologisches Merkmal des Interferons zeigt die Beobachtung, daß die Hemmwirkung viel deutlicher auftritt, wenn die Testzellen der homologen Tierart entstammen. Diese „Spezies-Spezifität“ wurde zuerst von Tyrell<sup>[28]</sup> an Interferon aus Kalbs- oder Hühnerfibroblasten beobachtet. Ähnliche Feststellungen gelangen an Küken- und Kaninchen-<sup>[29]</sup> sowie an Küken- und Entenzellen<sup>[7, 30]</sup>. In all diesen Fällen wirkte das Interferon im heterologen Gewebe schwächer. Häufig ist dort überhaupt keine Aktivität festzustellen. Diese „Spezies-Spezifität“ der antiviralen Wirkung – sei sie nun absolut oder graduell – gilt als ein wesentliches Charakteristikum des Interferon-systems.

In letzter Zeit ist die Allgemeingültigkeit der „Spezies-Spezifität“ angezweifelt worden. Bucknall<sup>[31]</sup> fand, daß Interferon der Affenspezies *Macaca* in Zellen zweier weiterer Genera (*Cercopithecus* und *Erythrocercus*) antivirale Aktivität entwickelte. Dieses Interferon zeigte also nicht nur keine „Spezies-Spezifität“, sondern sogar keine Genus-Spezifität. Merigan<sup>[32]</sup> beobachtete eine Kreuzreaktion von menschlichem und Kaninchen-Interferon in den entsprechenden Zellkulturen. Bucknall schlägt vor, in Zukunft davon abzusehen, die „Spezies-Spezifität“ der antiviralen Wirkung als typische Interferoneigenschaft anzusehen. Die Aufzählung der wichtigen Untersuchungen mit Interferon wäre unvollständig, würde man nichts über die Antigenität dieser Substanz sagen. Da Interferon (s. Abschnitt 4) zu den Proteinen gehört, versuchte man, Tiere mit Interferon zu immunisieren. Die ersten Versuche waren erfolglos<sup>[33-35]</sup>.

Paucker et al.<sup>[36, 37]</sup> konnten als erste ein Interferon-Antiserum erhalten. Meerschweinchen und Kaninchen wurden hoch gereinigte Interferonproben, die aus NDV-behandelten L-Zellen gewonnen wurden, intraperitoneal injiziert. Diese Behandlung wurde mehrere Male wiederholt. Auf diese Weise wurde ein Anti-

- [11] A. S. Huang u. R. R. Wagner, *Virology* 30, 173 (1966).
- [12] P. I. Marcus u. D. H. Carver, *J. Virol. (Baltimore)* 1, 334 (1967).
- [13] E. Zbovitz u. A. Brown, *J. Virol. (Baltimore)* 2, 1283 (1968).
- [14] M. A. Bratt u. H. Rubin, *Virology* 35, 395 (1968).
- [15] N. B. Finter: *Interferons*. North Holland, Amsterdam 1966.
- [16] G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor, Ciba Foundation, Symposium Interferon, J. A. Churchill, Ltd., London 1968.
- [17] J. Vilcek: *Interferon*. Springer, Heidelberg 1969.
- [18] M. S. Finkelstein u. T. C. Merigan, *Calif. Med.* 109, 24 (1968).
- [19] M. R. Hilleman, *Clin. Pharmacol. Therapeutics* 9, 517 (1968).
- [20] R. Z. Lockart, *Progr. med. Virology* 9, 451 (1967).
- [21] J. Ruiz-Gomez u. A. Isaacs, *Virology* 19, 8 (1963).

[\*] Abkürzungen:

- Newcastle-disease-Virus = NDV
- Vesicular-stomatitis-Virus = VSV
- Semliki-forest-Virus = SFV
- Translation-inhibitory-Protein = TIP
- [22] M. Ho u. J. F. Enders, *Virology* 9, 446 (1959).
- [23] L. A. Glasgow u. K. Habel, *J. exp. Medicine* 115, 503 (1962).
- [24] J. Vilcek, *Acta Virol.* 6, 144 (1962).
- [25] R. R. Wagner, A. H. Levy, R. M. Snyder, G. A. Ratcliff u. D. F. Hyatt, *J. Immunol.* 91, 112 (1963).

- [26] J. F. Enders, *Trans. Stud. Coll. Physicians Philadelphia* 28, 68 (1960).
- [27] R. F. Sellers, G. N. Mowat, J. H. Bennet u. D. A. Barr, *Arch. ges. Virusforsch.* 23, 12 (1968).
- [28] D. A. J. Tyrell, *Nature (London)* 184, 452 (1959).
- [29] A. Isaacs u. M. A. Westwood, *Lancet* 2, 324 (1959).
- [30] M. Ho u. J. F. Enders, *Virology* 9, 446 (1959).
- [31] R. A. Bucknall, *Nature (London)* 216, 1022 (1967).
- [32] T. C. Merigan, *Interferon Scientific Memoranda*, Memo Nr. 146/1 (1969).
- [33] D. C. Burke u. A. Isaacs, *Acta Virol.* 4, 215 (1960).
- [34] J. Lindenmann, *Z. Hyg. Infektionskrankh.* 146, 287 (1960).
- [35] A. Isaacs, *Advances Virus Res.* 10, 1 (1963).
- [36] K. Paucker u. K. Cantell, *Virology* 18, 145 (1962).
- [37] K. Paucker, *J. Immunol.* 94, 371 (1965).

serum gewonnen, das das L-Zellen-Interferon zu 99% inaktivierte. Antikörper gegen Mäuse- und Hühner-Interferon neutralisierten nur die Aktivität der homologen Präparationen. Die beiden Interferone unterscheiden sich also in ihren antigenen Eigenschaften. *Paucker* hält es für wahrscheinlich, daß alle früheren Versuche zur Gewinnung eines Antiserums deshalb gescheitert sind, weil zu wenig Interferon verabreicht wurde, denn beim Interferon handelt es sich offenbar um eine Substanz mit einer extrem hohen biologischen Aktivität, d.h., daß auch in den hochaktiven gereinigten Präparationen nur relativ wenige Interferon-Moleküle vorhanden sind (s. Abschnitt 4).

Eine interessante und bisher noch wenig erforschte Eigenschaft des Interferonsystems ist das Auftreten der refraktären Phase. *Cantell* und *Paucker*<sup>[38]</sup> stellten fest, daß die Interferonausschüttung nach Behandlung von L-Zellen mit inaktiviertem NDV nach 24 Stunden abgeschlossen war. Nach einer weiteren Behandlung mit NDV konnte keine erneute Interferonausschüttung nachgewiesen werden. *Ho* und *Kono*<sup>[39]</sup> bzw. *Youngner* und *Stinebring*<sup>[40]</sup> gelangen ähnliche Beobachtungen bei in-vivo-Untersuchungen. Kaninchen wurden mit Sindbis-Virus bzw. Endotoxin von *E. coli* – einem sehr potenter Interferon-Induktor – behandelt. Bei einer Wiederholung der Behandlung nach 24 Stunden war keine erneute Interferonausschüttung meßbar. *Ho* et al.<sup>[41]</sup> fanden im Serum toleranter Tiere einen humoralen Faktor, der die induzierende Wirkung von Endotoxin aufhob.

### 3. Methoden zur Interferonbestimmung

Das Prinzip aller Methoden zur Interferonbestimmung beruht auf der Tatsache, daß Interferon die Virusvermehrung verhindert. Äußerst wichtig für die Beurteilung der Ergebnisse sind die Versuchsbedingungen wie Art der Wirtszellen, Vorinkubationszeit mit Interferon, Art und Menge des Testvirus sowie Versuchstemperatur.

#### 3.1. Verringerung des Virus-Hämaggglutinin-Titers

Viele Viren – u.a. Influenza-Viren – sind in der Lage, Hämaggglutinin zu bilden. Die meßbare Hämaggglutininmenge ist der Anzahl der Viren proportional. Chorioallantois-Membranen von befruchteten Hühnereiern werden im interferon-enthaltenden Medium inkubiert und anschließend mit Influenza-Viren infiziert. Der Hämaggglutintiter ist – in Abhängigkeit vom Interferontiter – erniedrigt<sup>[8]</sup>.

[38] K. Cantell u. K. Paucker, *Virology* 21, 11 (1963).

[39] M. Ho u. Y. Kono, *J. clin. Invest.* 44, 1059 (1965).

[40] J. S. Youngner u. W. R. Stinebring, *Nature (London)* 208, 456 (1965).

[41] M. Ho, K. Kono u. M. K. Breinig, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 119, 1227 (1965).

#### 3.2. Verringerung der Hämadsorption (Methode der quantitativen Hämadsorption)

Das Phänomen der Hämadsorption besteht darin, daß viele virusinfizierte Zellen Erythrocyten adsorbieren können. Die Zellen werden mit der Interferonpräparation inkubiert, anschließend infiziert und mit Erythrocyten versetzt. Nach Entfernung der nicht adsorbierten werden die adsorbierten Erythrocyten lysiert; das freiwerdende Hämoglobin wird spektrophotometrisch gemessen. Die Methode ist einfach durchzuführen und ergibt zuverlässige Ergebnisse<sup>[42]</sup>.

#### 3.3. „Plaque inhibition“-Methode

Die Zellen werden mit der Interferonprobe inkubiert und anschließend mit einer bestimmten Menge eines plaque-bildenden Virus infiziert. Nach der Virusadsorption werden die Zellen mit Agar überschichtet. Der Interferontiter wird als reziproker Wert der größten Verdünnung der Interferonprobe angegeben, die die Plaquezahl gegenüber der Kontrollprobe um 50 % verringert<sup>[43]</sup>. Es wird gleichzeitig demonstriert, daß das Interferon weder die Virusadsorption verhindert noch extrazelluläre Viren inaktiviert.

#### 3.4. Indikator-Test

Normale Zellen geben Säuren ins Inkubationsmedium ab. Phenolrot, ein Bestandteil der meisten Zellkulturmiedien, schlägt dabei nach gelb um. Infizierte Zellen sezernieren nicht genügend Säuren für einen Farbumschlag; interferonbehandelte Zellen verhalten sich wie nicht infizierte Zellen, d.h. das Medium wird gelb. *Paucker*<sup>[37]</sup> nutzte diesen Effekt zur Entwicklung einer sehr zuverlässigen und empfindlichen Interferonbestimmungsmethode aus.

#### 3.5. Verringerung des cytopathischen Effekts

Die Vermehrung von Viren führt in bestimmten Geweben zu mikroskopisch sichtbaren cytopathischen Effekten. Die Hemmung dieser Effekte durch Vorbehandlung der Gewebe mit Interferonpräparationen wird ebenfalls zur Interferonbestimmung benutzt.

#### 3.6. Verhinderung des Einbaus von [<sup>14</sup>C]-Thymidin in Virus-DNA

*Bodo*<sup>[44]</sup> hat eine biochemische Methode zur Interferonbestimmung beschrieben. Er nimmt die Verringerung des Einbaus von [<sup>14</sup>C]-Thymidin in die säureunlösliche Virus-DNA-Fraktion (die zelluläre DNA wurde in Gegenwart von Triton-X-100 mit DNase abgebaut) als Maß für die Interferonmenge.

[42] N. B. Finter, *Virology* 24, 589 (1964).

[43] R. R. Wagner, *Virology* 13, 323 (1961).

[44] G. Bodo, *Interferon Scientific Memoranda, Memo Nr. 78* (1968).

#### 4. Chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften von Interferon

Isaacs und Lindenmann<sup>[8]</sup> beschrieben Interferon als eine Substanz, die nicht dialysierbar ist, bei 100000 x g nicht sedimentiert, durch Trypsin teilweise inaktiviert wird, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung präzipitiert und mit DNase keinen Aktivitätsverlust erleidet. Sie folgerten daraus, daß Interferon oder zumindest seine essentiellen Teile aus Protein bestehen müssen.

Andere Arbeitsgruppen bestätigten diese Annahme<sup>[45]</sup>. Man nimmt heute im allgemeinen an, daß der wirksame Teil des Interferons aus Protein mit einem kleinen Kohlenhydratanteil besteht. Als sicher gilt, daß es keine RNA oder DNA enthält.

Für die Versuche zur Isolierung des Interferons wurden die bekannten Methoden der Proteinchemie angewendet. Es muß hier noch einmal darauf hingewiesen werden, daß der einzige Interferonnachweis der biologische Test ist – eine Tatsache, die die Isolierung sehr erschwert. Zwei der bekanntesten Reinigungsmethoden werden im folgenden kurz beschrieben.

Lampson et al.<sup>[46]</sup> reinigten Interferon aus der Allantoisflüssigkeit von Hühnereiern, die mit Influenza-A-Viren infiziert waren, auf folgende Weise:

1. Ausfällen von Viren und inaktivem Protein mit 0.15 N  $\text{HClO}_4$ .
2. Präzipitieren von Interferon bei pH = 6 mit Zinkacetat. Nach Zentrifugation, Lösen des Rückstandes in 0.2 N HCl und Dialyse gegen 0.9-proz. NaCl-Lösung erneute Fällung mit Zinkacetat.
3. Auflösen des Niederschlags in 0.01 M Phosphatpuffer (pH = 6), Chromatographie auf Carboxymethylcellulose-Säule und Elution mit 0.01 M Phosphatpuffer (pH = 8)/0.1 M NaCl.
4. Erneute Behandlung der biologisch aktiven Fraktionen mit Zinkacetat.
5. Rechromatographie mit Carboxymethylcellulose.
6. Erneute Ausfällung mit Zinkacetat.
7. Zonenelektrophorese bei pH = 8.9 auf Pevikon.

Die spezifische Aktivität des so gereinigten Interferons betrug 236000 Einheiten/mg Protein<sup>[47]</sup>.

Ein Produkt mit einer noch höheren spezifischen Aktivität ( $1.6 \cdot 10^6$  Einheiten/mg Protein) erhielten Fantes et al.<sup>[48,49]</sup> nach folgendem Verfahren:

1. Adsorption von Interferon bei pH = 5 an Doucill (synthetisches Natriumaluminumsilicat) und Elution bei pH = 7.5 mit Kaliumthiocyanat.
2. Ausfällen der inaktiven Proteine bei pH = 2.
3. Präzipitation weiterer inerter Proteine durch Methanol (5 Volumenteile).
4. Ausfällen von Interferon durch Neutralisation der Lösung.
5. Auflösen des Interferons in 0.01 M Phosphatpuffer (pH = 7.5) und Filtration durch DEAE-Cellulose.

[45] K. H. Fantes, siehe [15], dort S. 119.

[46] G. P. Lampson, A. A. Tytell, M. M. Nemes u. M. R. Hilleman, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112, 468 (1963).

[47] Interferon-Einheiten werden im allgemeinen als der reziproke Wert der größten Verdünnung, die unter definierten Bedingungen noch einen Schutz der Zellen vor einer Virus-Attacke bewirkt, angegeben.

[48] K. H. Fantes, Nature (London) 207, 1298 (1965).

[49] K. H. Fantes, J. gen. Virol. 1, 257 (1967).

6. Chromatographie des Filtrats bei pH = 5.9 an einer Carboxymethyl-Sephadex-Säule. Die interferon-enthaltende Fraktion wurde mit steigendem pH-Gradienten eluiert.

Bei dieser Reinigung wurde eine 20000-fache Anreicherung erzielt. Die Wiederfindung betrug 7%.

Einen wesentlichen Fortschritt auf dem Gebiet der Interferonreinigung brachte die Anwendung der Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Dabei zeigte sich einerseits, daß alle hochgereinigten Produkte noch zahlreiche Verunreinigungen enthielten, und andererseits, daß Interferon selbst auch nicht einheitlich ist<sup>[45, 50, 51]</sup>. Die biologische Aktivität eines hochgereinigten Produktes ist nach der Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf eine breite Zone verteilt. Die biologisch aktiven Bestandteile der Interferonpräparation von Fantes et al.<sup>[52]</sup> unterschieden sich sowohl im Molekulargewicht als auch im isoelektrischen Punkt. Auch aus anderen Arbeiten geht hervor, daß es das Interferon wahrscheinlich nicht gibt, sondern daß wahrscheinlich auch beim gleichen Tier und dem gleichen Induktor gleichzeitig mehrere Substanzen mit interferon-ähnlichen Eigenschaften auftreten<sup>[53, 54]</sup>. So scheint es sicher zu sein, daß verschiedene Zellarten des gleichen Organismus verschiedene Interferone bilden<sup>[55, 56]</sup>. Die Molekulargewichte lagen zwischen 13000 und 160000<sup>[17]</sup>.

Eine Erklärung für diese Tatsachen steht noch aus. Ob es sich hier um Vorstufen des Interferons, um von verschiedenen Zellen produziertes Interferon, um Interferon mit verschiedenen Trägerproteinen oder um etwas ganz anderes handelt, ist bisher ungeklärt.

Da man davon ausgehen muß, daß keine der bisher isolierten und untersuchten biologisch aktiven Substanzen reines Interferon war, erscheint es ratsam, einen Teil der bisher festgestellten Stoffwerte und Eigenschaften, z.B. die Aminosäurezusammensetzung, mit Vorbehalt zu betrachten.

Einige Charakteristika können jedoch als allgemeingültig angenommen werden. Es handelt sich in allen Fällen um neutrale oder schwach basische Proteine oder proteinhaltige Verbindungen. Besonders erwähnenswert ist die Stabilität über einen weiten pH-Bereich. Lampson et al.<sup>[57]</sup> beobachteten, daß hochgereinigtes Hühner-Interferon über eine Stunde bei 23 °C im pH-Bereich von 1–10 stabil war. Diese Ergebnisse wurden mehrfach bestätigt. Die Stabilität bei pH = 2 gilt heute als wichtiges Charakteristikum aller Interferone. Die meisten Interferone sind relativ wärmebeständig. Lampson et al. fanden, daß gereinigtes Hühner-Interferon bei 66 °C eine Stunde völlig aktiv bleibt.

[50] T. C. Merigan, C. A. Winget u. C. B. Dixon, J. molecular Biol. 13, 679 (1965).

[51] K. H. Fantes, II. Int. Sympos. med. appl. Virol., Ft. Lauderdale.

[52] K. H. Fantes in G. Rita: The Interferons. Academic Press, New York 1968, S. 213.

[53] R. R. Wagner u. T. S. Smith, siehe [16], dort S. 95.

[54] Y. H. Ke, M. Ho u. T. C. Merigan, Nature (London) 211, 541 (1966).

[55] E. Falcott, F. Fournier u. C. Chany, Ann. Inst. Pasteur 111, 241 (1966).

[56] M. Ho u. Y. H. Ke, Interferon Scientific Memoranda, 218/1 (1969).

[57] G. P. Lampson, A. A. Tytell, M. M. Nemes u. M. R. Hilleman, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121, 441 (1965).

Erst bei 76 °C tritt teilweise Inaktivierung ein. Die biologische Aktivität von Interferon wird durch proteolytische Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin zerstört, durch DNase, RNase, Lipase, Peptidase und  $\alpha$ -Amylase dagegen nicht.

Es wurde bereits erwähnt, daß heute im allgemeinen davon ausgegangen wird, daß Interferon oder zumindest ein wirksamer Anteil aus Protein besteht. Eine japanische Arbeitsgruppe<sup>[58, 59]</sup> beschreibt eine interferon-ähnliche Verbindung, die aus Kaninchenhaut isoliert wurde, die mit Vaccinia-Virus infiziert war. Diese Verbindung wird als proteinfreies Polysaccharid (Molekulargewicht 10000) beschrieben, das nur in vivo aktiv ist und keine „Spezies-Spezifität“ hat. Ob diese Substanz der wirksame Teil des Interferons ist, der im Organismus mit einem spezies-spezifischen Protein zusammentritt und damit ein „normales“ Interferon-Molekül bildet, oder ob es sich um eine interferon-induzierende Verbindung handelt, blieb bisher ungeklärt.

## 5. Die Wirkungsweise von Interferon

*Isaacs et al.*<sup>[60, 61]</sup> beobachteten in interferon-behandelten Zellen eine gesteigerte Glykolysegeschwindigkeit. Weiterhin wurde festgestellt, daß die direkte Oxidation der Glucose über den Pentosephosphatzyklus vermindert war und daß weniger anorganisches Phosphat eingebaut wurde. Da die gleichen Stoffwechseländerungen durch chemische Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung hervorgerufen werden, zogen *Isaacs et al.* den Schluß, daß Interferon ebenfalls als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung wirkt – und zwar nicht in den Mitochondrien, sondern am Zellkern. *Lampson et al.*<sup>[62]</sup> konnten aber später nachweisen, daß die beschriebenen Effekte ausbleiben, wenn die Untersuchungen mit hochgereinigten Interferonpräparationen durchgeführt werden. Es gilt heute als sicher, daß die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und die anderen Effekte auf die nicht infizierte Zelle durch Verunreinigungen hervorgerufen wurden<sup>[63]</sup>.

Bevor sich ein Virus innerhalb der Wirtszelle vermehren kann, müssen die folgenden Vorgänge ablaufen: Adsorption des Virus an der Zelloberfläche, Penetration in die Zelle und Freisetzung der Virusnukleinsäure durch Entfernung der Proteinhülle („Uncoating“).

Interferon hat keinen Einfluß auf die Adsorption der Viren<sup>[64, 65]</sup>. Aus der Tatsache, daß auch die Vermehr-

[58] Y. Nagano, Y. Kojima, T. Haneishi u. M. Shirasaka, Jap. J. exp. Med. 36, 535 (1966).

[59] Y. Nagano, Y. Kojima u. R. S. Kanashiro, Jap. J. exp. Med. 36, 477 (1966).

[60] A. Isaacs, Virology 10, 144 (1960).

[61] A. Isaacs, H. G. Klemperer u. G. Hitchcock, Virology 13, 191 (1961).

[62] G. P. Lampson, A. A. Tytell, M. M. Nemes u. M. R. Hilleman, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112, 468 (1963).

[63] S. Baron, T. C. Merigan u. L. M. McKerlie, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121, 50 (1966).

[64] A. Isaacs u. D. C. Burke, Brit. med. Bull. 15, 185 (1959).

ung von infektiöser RNA, die aus Viren isoliert wurde, durch Interferon gehemmt wird, wurde gefolgert, daß Interferon weder die Penetration des intakten Virus noch die Freisetzung der Virusnukleinsäure beeinflußt<sup>[66, 67]</sup>.

Diese Folgerung scheint – zumindest für spezielle DNA-Viren – nicht unbedingt richtig zu sein, denn neuere Befunde von *Magee et al.*<sup>[68]</sup> machen es wahrscheinlich, daß Interferon den „Uncoating“-Prozeß bei Vaccinia-Viren inhibiert. Da man weiß, daß die „Uncoating“-Enzyme mancher DNA-Viren Virusproteine sind<sup>[69]</sup>, kann dieser Effekt auf eine Hemmung der virus-spezifischen Proteinsynthese zurückzuführen sein. Eine direkte inaktivierende Wirkung von Interferon auf das komplexe Viruspartikel konnte ebenso ausgeschlossen werden<sup>[70, 71]</sup> wie eine inaktivierende Wirkung auf virale RNA<sup>[72]</sup>. Daraus kann gefolgert werden, daß die Wirkung des Interferons auf einer Verhinderung der Synthese virus-spezifischer Proteine oder viralen Nukleinsäuren beruhen muß.

RNA-Viren vermehren sich wie folgt:

1. Die „frühen“ Cistrone des parentalen RNA-Moleküls (plus-Strang) codieren direkt als m-RNA für die Synthese der „frühen“ Enzyme wie der RNA-abhängigen RNA-Polymerase.
2. Mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase wird die „replikative“ Form des Virus gebildet, d.h. am parentalen plus-Strang wird ein zweiter RNA-Strang (minus-Strang) synthetisiert, der dann wiederum als Matrize für die Synthese von plus-Strängen dient.
3. Translation der „späteren“ Cistrone und damit Synthese des viralen Hüllproteins.
4. Kombination von viraler RNA (plus-Strang) mit Hüllprotein zum intakten Virus.

Die Synthese von viraler RNA ist in interferon-behandelten Zellen gehemmt<sup>[73–75]</sup>. Das bedeutet, daß entweder die Synthese oder die Wirkung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase durch Interferon gestört wird. *Sonnabend, Martin und Mécs*<sup>[75]</sup> zeigten, daß Interferon im zellfreien System keinen Einfluß auf die Aktivität der RNA-Polymerase von Semliki-forest-Virus (SFV) hat.

*Miner, Ray und Simon*<sup>[76]</sup> untersuchten den Effekt eines Homogenates von interferon-behandelten L-Zellen auf Mengo-Virus-RNA-Polymerase und stellten

[65] P. de Somer, A. Prinzie, P. Denys u. E. Schonne, Virology 16, 63 (1962).

[66] M. Ho, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107, 639 (1961).

[67] S. E. Grossberg u. J. J. Holland, J. Immunol. 88, 708 (1962).

[68] W. E. Magee, S. Levine, O. V. Mille, R. D. Hamilton, Virology 35, 505 (1968).

[69] B. Woodson, Bacteriol. Reviews 32, 127 (1968).

[70] M. Ho u. J. F. Enders, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 385 (1959).

[71] R. R. Wagner, Virology 13, 323 (1961).

[72] V. Mayer, F. Sokol u. J. Vilcek, Acta Virology 5, 264 (1961).

[73] C. Cocito, E. de Maeyer u. P. de Somer, Life Sci. 1, 753 (1962).

[74] J. Taylor, Virology 25, 340 (1965).

[75] J. A. Sonnabend, E. M. Martin u. E. Mécs, Nature (London) 213, 365 (1967).

[76] N. Miner, W. J. Ray u. E. H. Simon, Biochem. biophysic. Res. Commun. 24, 264 (1966).

fest, daß deren Aktivität nicht verringert war. Die gleichen Autoren fanden aber, daß eine Vorbehandlung von L-Zellen mit Interferon den Gehalt an virus-spezifischer RNA-Polymerase nach einer Mengovirus-Infektion deutlich verringert. Auch Sonnabend et al. wiesen eine Verringerung der extrahierbaren SFV-RNA-Polymerasemenge bei der Vorbehandlung von L-Zellen mit Interferon nach. Das bedeutet, daß nicht die Wirkung, sondern die Synthese der viralen RNA-Polymerase gehemmt wird.

Marcus und Salb<sup>[77]</sup> konnten zeigen, daß Sindbis-Virus-RNA und Ribosomen von interferon-behandelten Hühnerembryozenlen zwar einen Polysomenkomplex bilden, aber keine Aminosäuren einbauen können. Die Wirkung von Interferon auf die Vermehrung von RNA-Viren besteht also offenbar in einer Verhinderung der Translation der viruspezifischen m-RNA, also in der Hemmung der Synthese von Virusproteinen.

Die Vermehrung von DNA-Viren verläuft in folgender Reihenfolge:

1. „Frühe“ Transkription des viralen DNA-Moleküls unter Bildung „früher“ viraler m-RNA.
2. Translation der „frühen“ m-RNA in „frühe“ Proteine.
3. Synthese von viraler DNA.
4. Bildung der „späten“ m-RNA.
5. Translation der „späten“ m-RNA in virale Hüllproteine.
6. Kombination von viraler DNA und Hüllprotein zum intakten Virus (Maturation).

In mehreren Systemen konnte gezeigt werden, daß die Synthese von Virus-DNA in interferon-behandelten Zellen inhibiert wird<sup>[78, 79]</sup>.

Joklik und Merigan<sup>[80]</sup> wiesen nach, daß im System L-Zellen/Vaccinia-Virus die Synthese viraler m-RNA durch Interferon nicht beeinflußt wird. Durch die Virusinfektion tritt eine Desintegration der Wirts-Polyribosomen ein, der eine Bildung virus-spezifischer Polyribosomen mit viraler m-RNA folgt. In Gegenwart von Interferon bleibt die Bildung dieser Polyribosomen aus, was zur Folge hat, daß keine virus-spezifischen Proteine – also auch keine DNA-Polymerase – synthetisiert wird.

Wenn man nach Gemeinsamkeiten der inhibierenden Wirkung von Interferon auf die Vermehrung von RNA- und DNA-Viren sucht, kann festgestellt werden, daß in beiden Fällen die „frühe“ Translation von viruspezifischer Botschaft, d.h. die Bildung der „frühen“ viruspezifischen Proteine, verhindert wird. Ob die Inhibition auf einer Verhinderung der Ablesung der m-RNA im Polyribosom beruht oder ob die Bildung der Polyribosomen selbst unterdrückt wird, ist noch nicht endgültig geklärt. Möglicherweise können auch beide Effekte auftreten. Die Frage nach dem Ort der Interferonwirkung scheint damit gelöst zu sein. Offen bleibt aber immer noch die Art der molekularen Wirkungsweise.

[77] P. I. Marcus u. J. M. Salb, *Virology* 30, 502 (1966).

[78] S. N. Ghosh u. G. E. Gifford, *Virology* 27, 186 (1965).

[79] S. Levine, W. E. Magee, R. D. Hamilton u. O. V. Miller, *Virology* 32, 33 (1967).

[80] W. K. Joklik u. T. C. Merigan, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 56, 558 (1966).

Taylor<sup>[81]</sup> stellte fest, daß Actinomycin C, welches bekanntlich die zelluläre DNA-abhängige RNA-Synthese hemmt, die antivirale Wirkung von Interferon unterbindet. Die gleiche Wirkung haben manche Inhibitoren der Proteinbiosynthese wie Puromycin<sup>[82, 83]</sup> und p-Fluorphenylalanin<sup>[84]</sup>. Zur Entfaltung der antiviralen Wirkung von Interferon ist also eine intakte zelluläre RNA- und Proteinsynthese notwendig. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß Interferon die Bildung eines zweiten Proteins induziert, welches die eigentliche antiviral wirksame Substanz ist („antivirales Protein“, „Translation Inhibitory Protein (TIP)“)<sup>[77, 85]</sup>.

Wenn man das Regulationsmodell von Jacob und Monod zur Erklärung dieser Vorgänge verwendet, kann man sich die Entfaltung der antiviralen Wirkung von Interferon etwa wie in Abbildung 1 vorstellen. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, einen direkten experimentellen Nachweis für die Existenz von TIP zu erbringen. Vilcek et al.<sup>[86, 87]</sup> konnten mit einer Doppelmarkierungsmethode zeigen, daß die ribosomale Proteinfaktion interferonbehandelter Zellen nach der Polyacrylamid-Elektrophorese eine andere Aktivitätsverteilung als die normaler Zellen aufwies. Die Autoren fanden eine völlig neue Bande und einen erhöhten Aminosäureeinbau in zwei weiteren Proteinbanden. Eine Charakterisierung eines oder mehrerer dieser Proteine als TIP steht noch aus.

Marcus und Salb<sup>[88]</sup> ließen Trypsin unter milden Bedingungen auf Ribosomen interferon-behandelter Zellen einwirken. Diese Ribosomen waren in der Lage, bei 0 °C mit Sindbis-RNA einen Polysomenkomplex zu bilden, der bei 37 °C unter Einbau von Aminosäuren schnell wieder zerfiel. Dies wird von Marcus und Salb als Zeichen für eine normale Translation angesehen, da sich der entsprechende Komplex mit interferon-behandelten, nicht trypsinisierten Ribosomen nicht zersetze und keine Aminosäuren einbaute.

Dianzani, Buckler und Baron<sup>[89]</sup> fanden überraschend, daß Cycloheximid – ein weiterer Inhibitor der Proteinbiosynthese – die antivirale Wirkung von Interferon nicht unterbindet. Die Autoren halten es für möglich, daß die m-RNA für TIP in Gegenwart des Inhibitors gebildet wird und relativ stabil bleibt und daß die Zeit nach Entfernung des Cycloheximids und vor Zugabe des Virus ausreicht, um mit dieser m-RNA genügend TIP zu bilden.

[81] J. Taylor, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 14, 447 (1964).

[82] R. M. Friedman u. J. A. Sonnabend, *J. Immunol.* 95, 696 (1965).

[83] S. Levine, *Virology* 24, 587 (1964).

[84] R. M. Friedman u. J. A. Sonnabend, *Nature (London)* 203, 366 (1964).

[85] J. Taylor, *Virology* 25, 340 (1965).

[86] M. H. Ng, J. Vilcek u. T. G. Rossman, *Bacteriol. Proc.* 1969, 147.

[87] J. Vilcek, M. H. Ng u. T. G. Rossman in G. Rita: *The Interferons*. Academic Press, New York 1968, S. 185.

[88] P. I. Marcus u. J. M. Salb in G. Rita: *The Interferons*. Academic Press, New York 1968, S. 111.

[89] F. Dianzani, C. E. Buckler u. S. Baron, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 130, 519 (1969).

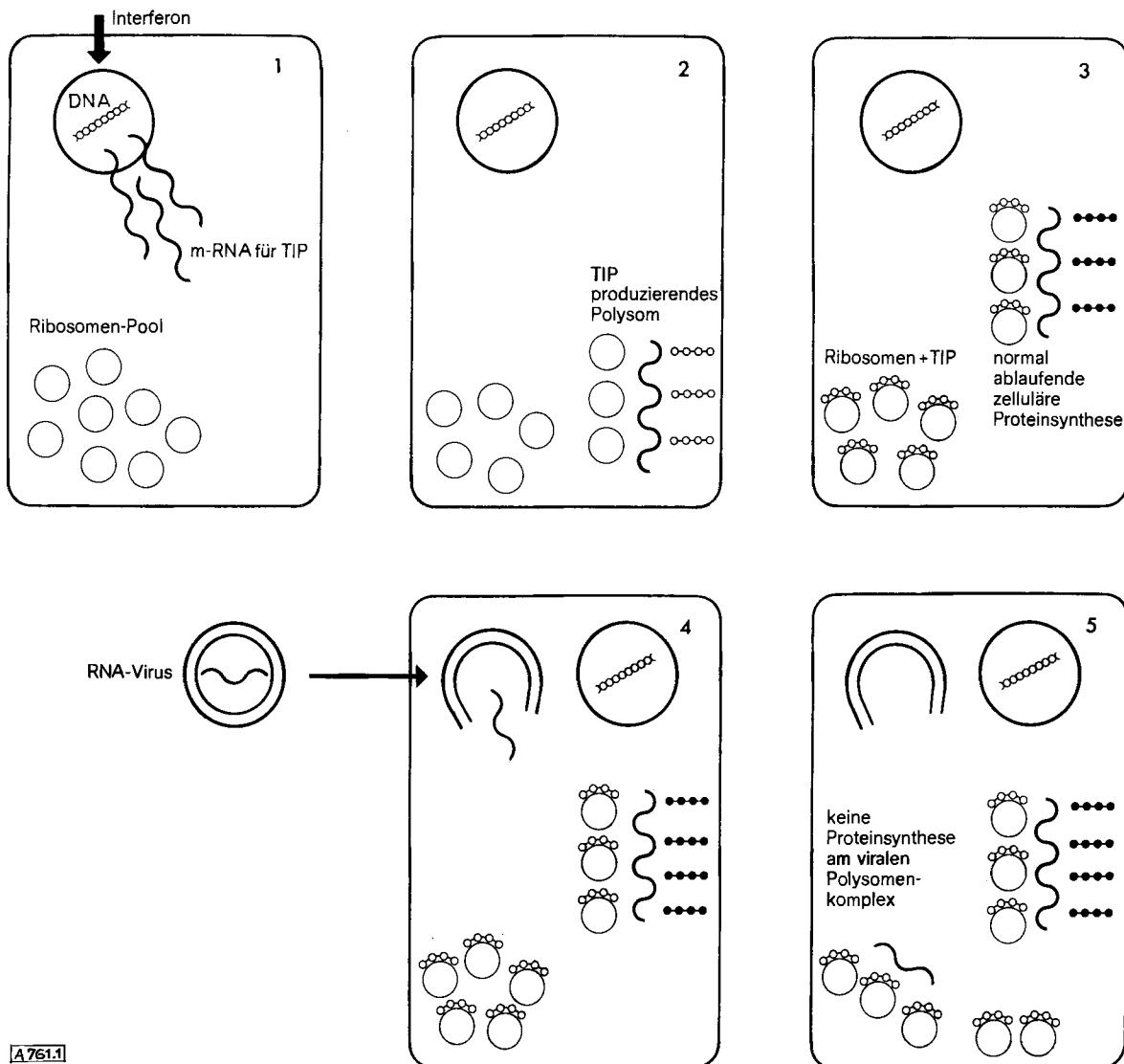


Abb. 1. Wirkungsweise von Interferon nach Marcus und Sab [77] sowie Hilleman [19].

- 1: Interferon dringt in die uninfizierte Zelle ein und induziert die Synthese von m-RNA für TIP.
- 2: Mit dieser m-RNA synthetisiert die Zelle TIP.
- 3: TIP tritt mit den Ribosomen in Wechselwirkung, ohne dadurch die zelluläre Proteinsynthese zu beeinflussen.
- 4: In die Zelle dringt ein Virus ein.
- 5: Die virale RNA tritt zwar mit dem TIP-Ribosomenkomplex zusammen, aber es wird kein virales Protein synthetisiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der endgültige Nachweis für die Existenz eines oder mehrerer antiviral wirksamer Proteine, deren Synthese durch Interferon angeregt wird, noch aussteht, daß aber der überwiegende Teil der experimentellen Befunde dieses Denkmodell stützt. Nachzutragen wäre noch, daß im Falle einer Bestätigung dieser Theorie die Bildung der m-RNA und die Synthese von TIP die einzigen Effekte von Interferon auf die normale, d.h. nicht infizierte Zelle wären.

## 6. Interferon-Induktoren

Wie bereits erwähnt, können sowohl intakte als auch inaktivierte, d.h. nicht vermehrungsfähige Viren die Bildung von Interferon induzieren. Diese Interferon-Induktionsfähigkeit scheinen alle Viren zu haben, gleich welcher Klasse sie angehören. Seit einigen Jahren ist bekannt, daß außer Viren noch andere Agenten die Interferonbildung anregen können. Dazu ge-

hören Bakterien, Rickettsien, Phytohämagglutinin, Toxoplasmen, Mycoplasmen, Protozoen, Cycloheximid sowie einige anionische Copolymerne und Nucleinsäuren.

### 6.1. Bakterien und bakterielle Endotoxine

Bereits vor Entdeckung des Interferons war die hemmende Wirkung von Bakterien auf das Wachstum einiger Viren bekannt. Armstrong<sup>[90]</sup> beobachtete bereits 1938, daß bestimmte Myxo-Virusinfektionen bei Mäusen durch Bakterien verhindert werden. Horsfall und McCarty<sup>[91]</sup> stellten fest, daß die Virusvermehrung in den Lungen von Mäusen, die mit Pneumonieviren infiziert waren, um das 10- bis 100-fache verringert wurde, wenn die Tiere zusätzlich mit einem nicht-hämolytischen Streptococcus-MG'-Stamm behandelt wurden.

[90] C. Armstrong, Public Health Rep. 53, 2004 (1938).

[91] F. L. Horsfall u. M. McCarty, J. exp. Medicine 85, 623 (1947).

*Youngner* und *Stinebring*<sup>[92]</sup> zeigten als erste, daß Bakterien als Interferon-Induktoren auftreten können. Sie infizierten Hühner mit einem virulenten Stamm von *Brucella abortus* und fanden im Serum der Tiere eine antivirale Aktivität. Die Substanz, die dafür verantwortlich war, zeigte die gleichen physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften wie Interferon. Auch nach der Behandlung von Mäusen mit gereinigten *E.-coli*-Endotoxin fanden sie eine interferon-ähnliche Substanz<sup>[93]</sup>. Die Vermehrung der Bakterien ist also keine notwendige Voraussetzung für die Interferon-Induktion. Ähnliche Ergebnisse erhielt *Ho*<sup>[94]</sup> mit Endotoxin, das er Kaninchen verabreichte. *Hopps et al.*<sup>[95]</sup> konnten aus Hühnerembryozellen, die mit *Rickettsia tsutsugamuchi* beimpft waren, ebenfalls eine interferon-ähnliche Substanz isolieren. Es gibt Hinweise, daß durch die Behandlung mit Endotoxin nicht die Interferon-Synthese angeregt wird, sondern nur präformierte Moleküle ausgeschüttet werden. Das endotoxininduzierte Interferon erscheint früher im Serum von behandelten Kaninchen als virus-induziertes Interferon, und außerdem läßt sich seine Bildung nicht durch Actinomycin D hemmen<sup>[96]</sup>.

## 6.2. Phytohämagglutinin

Phytohämagglutinin ist eine Substanz, die in einem Extrakt aus *Phaseolus vulgaris* enthalten ist. *Wheellock*<sup>[97]</sup> stellte fest, daß dieses Pflanzenprodukt in menschlichen Leukocyten antiviral wirksam ist; die cytopathische Wirkung von Sindbis-Virus wurde vermindert. Die antiviral wirksame Substanz ließ sich – wie Interferon – weder dialysieren noch sedimentieren.

## 6.3. Synthetische anionische Copolymeren

*Regelson*<sup>[98]</sup> fand 1966, daß Copolymeren aus Maleinsäureanhydrid und Divinyläther (Molekulargewicht 17000–450000) in Mäusen nach intraperitonealer Verabreichung eine antivirale Aktivität entwickeln, die im Serum 24 Stunden nach der Injektion auftritt.

*Merigan*<sup>[99]</sup> konnte zeigen, daß diese antiviral wirkende Substanz alle Eigenschaften von Interferon zeigte. Der gleiche Induktor hemmte auch die virusbedingte Leukämie bei Mäusen und in einigen klinischen Untersuchungen auch die Neoplasmabildung bei Menschen<sup>[100]</sup>. Mit Copolymeren aus Maleinsäure-

- [92] J. S. Youngner u. W. R. Stinebring, Science 144, 1022 (1964).
- [93] W. R. Stinebring u. J. S. Youngner, Nature (London) 204, 712 (1964).
- [94] M. Ho, Science (Washington) 146, 1472 (1964).
- [95] H. E. Hopps, S. Khono, M. Khono u. J. E. Smadel, Bacteriol. Proc. 1964, 115.
- [96] Y. Khono u. M. Ho, Virology 25, 162 (1965).
- [97] E. F. Wheellock, Science (Washington) 149, 310 (1965).
- [98] W. Regelson, Proc. Int. Sympos. on Atherosclerosis and Reticuloendothelial System, Como/Italien, September 1966.
- [99] T. C. Merigan, Science (Washington) 416, 214 (1967).
- [100] T. C. Merigan u. W. Regelson, Clin. Res. 15, 309 (1967).

anhydrid und Vinylmethyläther oder Vinylacetat konnte ebenfalls eine Interferon-Induktion nachgewiesen werden<sup>[101]</sup>. Die entsprechenden Styrolverbindungen waren schlechtere und stärker toxische Induktoren.

Einige dieser Copolymeren wurden klinisch getestet. Ein Maleinsäureanhydrid/Divinyläther-Polymerisat vom Molekulargewicht 17000 wurde in den USA zur Prüfung als Antitumormittel zugelassen. Ein entscheidender Nachteil dieser Verbindungen ist, daß sie im Organismus nicht abgebaut werden und sich im reticuloendothelialen System ablagern<sup>[102]</sup>. Bisher ist es nicht gelungen, eine Interferon-Induktion in vitro festzustellen. Die genaue Wirkungsweise dieser Polymeren ist nicht bekannt. Es wird diskutiert, daß die antivirale Wirkung nicht nur auf der Bildung von Interferon, sondern auch auf einer direkten Wechselwirkung mit der Zelle aufgrund der polyanionischen Struktur der Moleküle beruht.

## 6.4. Nucleinsäuren

1961 stellte *Isaacs*<sup>[103]</sup> die Theorie auf, daß die Interferonbildung eine Reaktion der Zelle auf die Wechselwirkung mit einer „fremden“ Nucleinsäure ist, so wie sich Antikörper aufgrund der Unterscheidung zwischen „fremden“ und „eigenen“ Proteinen bilden.

*Rotem et al.*<sup>[104]</sup> hatten festgestellt, daß Mäuseleber-RNA das Wachstum von Pockenviren in Kükenzellkulturen hemmt, genauso wie Küken-RNA in Mäusezellkulturen. Mit der homologen RNA trat eine wesentlich geringere Hemmung auf. *Isaacs*<sup>[105]</sup> setzte diese Untersuchungen fort und stellte fest, daß Nucleinsäuren in homologen Zellen keine Interferonbildung induzieren. Nach Behandlung mit salpetriger Säure war die RNA aber dazu in der Lage. *Isaacs* folgerte daraus, daß die RNA durch die Desaminierung so verändert wurde, daß sie von den Zellen als „fremde“ Nucleinsäuren erkannt wurde. Obwohl einige spätere Befunde dieses Konzept stützten<sup>[106–108]</sup>, fand die Theorie von *Isaacs* keine allgemeine Anerkennung. *Isaacs*<sup>[109]</sup> teilte 1965 mit, daß er selbst auch „unterschiedliche Ergebnisse“ bei weiteren Untersuchungen erhalten habe.

Die Theorie von den „fremden“ Nucleinsäuren als Interferon-Induktoren erhielt weitere experimentelle Stützen aus dem Arbeitskreis von *Hilleman*. Dort war man seit mehreren Jahren auf der Suche nach einem potentiellen Interferon-Induktor, der sich für eine klinische Anwendung eignen könnte. *Hilleman* berichtete

- [101] T. C. Merigan, Nature (London) 214, 416 (1967).
- [102] T. C. Merigan siehe [16], S. 50.
- [103] A. Isaacs, Natur (London) 192, 1247 (1961).
- [104] Z. Rotem, R. A. Cox u. A. Isaacs, Nature (London) 197, 564 (1963).
- [105] A. Isaacs, R. A. Cox u. Z. Rotem, Lancet 2, 113 (1963).
- [106] H. Kohlhage u. D. Falke, Arch. ges. Virusforsch. 14, 404 (1964).
- [107] K. E. Jensen, A. L. Neal, R. I. Owens u. J. Warren, Nature (London) 200, 433 (1963).
- [108] K. Takano, J. Warren, K. E. Jensen u. A. L. Neal, J. Bacteriol. 90, 1542 (1965).
- [109] A. Isaacs, Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 43, 405 (1965).

über Versuche, Viren in ihre Bestandteile zu zerlegen und diese Einzelfraktionen auf ihre Interferon-Induktionsfähigkeit zu untersuchen<sup>[110]</sup>. Diese Versuche waren ohne Erfolg.

Braun und Nakano berichteten<sup>[111], [112]</sup>, daß es ihnen gelungen sei, mit einigen synthetischen Oligonucleotiden die Antikörpersynthese zu stimulieren. Das veranlaßte die Hilleman-Gruppe, die Interferon-Induktionsfähigkeit synthetischer Polynucleotide zu prüfen. Diese Untersuchungen waren von Erfolg gekrönt. Wenige µg eines doppelsträngigen Komplexes aus Polyinosinsäure und Polycytidinsäure (Poly-I:C) führten zur Interferon-Induktion in Mäusen<sup>[113]</sup>. Die Tiere wurden durch dieses Interferon vor einer tödlichen Dosis Columbia-SK-Viren geschützt. Ein doppelsträngiger Komplex von Polyadenin und Polyuridin (Poly-A:U) und eine Mischung von Polyinosinsäure und Cytidylcytidin (I + CpC) waren ebenfalls aktiv, wenn auch schwächer. Inaktiv waren dagegen die einzelsträngigen Polynucleotide und einige Oligonucleotide, Dinucleotide, Nucleotide und Nucleoside. Mit Poly-I:C konnte auch in vitro eine Interferonbildung nachgewiesen werden.

Diese Befunde führten zur Suche nach anderen Arten doppelsträngiger RNA. Es gelang Hilleman und seinen Mitarbeitern, eine solche doppelsträngige RNA aus Helenin zu isolieren. (Helenin ist ein antiviral wirksamer Extrakt aus *Penicillium funiculosum*<sup>[114]</sup>.) Rytel<sup>[115]</sup> konnte zeigen, daß Helenin in vivo und in vitro die Interferonbildung induzieren kann. Die doppelsträngige RNA aus Helenin war ebenfalls ein ausgezeichneter Interferon-Induktor<sup>[116]</sup>.

Wenig später wurde festgestellt, daß das antiviral wirkende Prinzip von Statolon, einem Extrakt aus *Penicillium staloniferum*, ebenfalls eine doppelsträngige Ribonucleinsäure ist<sup>[117]</sup>. Eine weitere Quelle natürlich vorkommender doppelsträngiger RNA ist die replikative Form von RNA-Viren. Die replikative Form des Bakteriophagen MS2 wurde isoliert und erwies sich schon in kleinsten Mengen als Interferon-Induktor<sup>[118]</sup>. Ein ähnliches Ergebnis fand man mit gereinigter Reovirus-RNA<sup>[119]</sup>. Das Reovirus gehört zu den wenigen Viren, deren Nucleinsäurekern aus doppelsträngiger RNA besteht.

Interessant ist auch die Beobachtung, daß die Interferon-Induktionsfähigkeit von Poly-I:C durch Zu-

[110] M. R. Hilleman, J. cellular Physiol. 71, 43 (1968).

[111] W. Braun u. M. Nakano, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 119, 701 (1965).

[112] W. Braun u. M. Nakano, Science (Washington) 157, 819 (1967).

[113] A. K. Field, A. A. Tytell, G. P. Lampson u. M. R. Hilleman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1004 (1967).

[114] R. E. Shope, J. exp. Medicine 123, 213 (1966).

[115] M. W. Rytel, R. E. Shope u. E. D. Kilbourne, J. exp. Medicine 123, 577 (1966).

[116] G. P. Lampson, A. A. Tytell, A. K. Field, M. M. Nemes u. M. R. Hilleman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 782 (1967).

[117] L. F. Ellis u. W. J. Kleinschmidt, Nature (London) 215, 215 (1967).

[118] A. A. Tytell, G. P. Lampson, A. K. Field u. M. R. Hilleman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1719 (1967).

[119] A. A. Tytell, G. P. Lampson, A. K. Field u. M. R. Hilleman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1719 (1967).

gabe von DEAE-Dextran um das 100-fache gesteigert werden kann<sup>[120]</sup>. Es stellt sich nun die Frage, weshalb diese doppelsträngigen Ribonucleinsäuren zu den potentesten Interferon-Induktoren gehören. Auszuschließen ist, daß diese Nucleinsäuren eine genetische Information übermitteln, denn die doppelsträngigen Homopolynucleotide wie Poly-I:C sind dazu nicht in der Lage.

Zwei Erklärungen bieten sich an: Hilleman glaubt, daß das Auftreten der doppelsträngigen replikativen Form, einer der ersten Schritte der Vermehrung von RNA-Viren, normalerweise das Startsignal für die Interferon-Synthese ist. Durch die Gabe von doppelsträngiger RNA wird der Zelle eine Virusvermehrung vorgetäuscht und damit die Interferon-Synthese ausgelöst. Der schwache Punkt an dieser Theorie ist, daß auch nicht vermehrungsfähige RNA-Viren und vor allem auch DNA-Viren gute Interferon-Induktoren sind, obgleich nach dem heutigen Stand des Wissens in keinem dieser beiden Fälle eine doppelsträngige RNA auftreten soll.

Besonderes Interesse verdient in diesem Zusammenhang der überraschende Befund von Colby und Duesberg<sup>[121]</sup>, daß in Hühnerembryozellen nach der Infektion mit Vaccinia-Virus, also einem DNA-Virus, die 10-fache Menge an doppelsträngiger RNA zu finden ist wie in der uninfizierten Zelle. Nach den zur Zeit allgemein akzeptierten Vorstellungen von der Vermehrung der DNA-Viren gibt es keine Erklärung für das Auftreten doppelsträngiger RNA nach einer Vaccinia-Virusinfektion. Ebensowenig gibt es eine Erklärung für die Existenz doppelsträngiger RNA in der uninfizierten Zelle. Erwähnenswert ist noch, daß auch Montagnier<sup>[122]</sup> in normalen Rattenleberzellen doppelsträngige RNA nachweisen konnte.

Eine zweite Erklärung für die gute Induktionsfähigkeit von doppelsträngiger RNA ist das Prinzip der „fremden“ Nucleinsäure von Isaacs. Doppelsträngige RNA zeichnet sich bekanntlich durch eine besondere Stabilität gegenüber RNase aus und hat damit eine größere Chance, die Zelle zu erreichen, als alle anderen Nucleinsäurespezies, die sehr schnell von Nucleasen abgebaut werden.

## 7. Ausblick

Es hat nicht an Überlegungen und Versuchen gefehlt, das Interferonsystem bei der Kontrolle von Viruserkrankungen einzusetzen. Das breite antivirale Wirkungsspektrum, die fehlende Toxizität und die geringe Antigenität lassen Interferon besonders geeignet dazu erscheinen. Die Viruserkrankungen, für die nur eine begrenzte Anzahl serologisch zu unterscheidender Erregertypen verantwortlich sind und die außerdem zu einer langanhaltenden Immunität führen, werden

[120] F. Dianzani, P. Cantagalli, S. Goagnoni u. G. Rita, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 128, 708 (1967).

[121] C. Colby u. P. H. Duesberg, Nature (London) 222, 940 (1969).

[122] L. Montagnier, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci., Sér. D 1968, 1417.

heute weitgehend durch Impfungen unter Kontrolle gehalten. Das ist z.B. bei Masern, Pocken, Gelbfieber oder Poliomyelitis der Fall. Daneben gibt es Anfänge einer Viruschemotherapie mit Joddesoxyuridin, Adamantamin und Methylisatin- $\beta$ -thiosemicarbazone bei der Behandlung von Herpes-, Influenza- bzw. Pockeninfektionen.

Die Hoffnung, daß Interferon zu einer wirksamen Kontrolle von Viruserkrankungen beitragen könnte, wurde neu bestärkt, als 1967 von *Hilleman et al.* einige doppelsträngige Ribonucleinsäuren als äußerst potente Interferon-Induktoren beschrieben wurden. *Park und Baron*<sup>[123]</sup> sowie *Pollikoff*<sup>[124]</sup> konnten außerdem feststellen, daß Interferon nicht nur zur prophylaktischen, sondern auch zur therapeutischen Behandlung geeignet ist. Sie beobachteten, daß bei Kaninchen eine Herpes-Konjunktivitis durch die Behandlung mit Poly-I:C wesentlich schneller und besser ausheilte. Die therapeutische Wirkung wurde sowohl bei örtlicher als auch bei systemischer Verabreichung beobachtet. *Guerra et al.*<sup>[125]</sup> berichteten über die Behand-

[123] *J. H. Park u. S. Baron*, Science (Washington) 162, 811 (1968).

[124] *R. Pollikoff, P. Cannavale, P. Dixon u. A. Dipuppo*, Bacteriol. Proc. 1969, 150.

[125] *R. Guerra, R. Frezzotti, R. Bonanni, F. Dianzani u. G. Rita*, II. Conf. Antiviral Substances New York, Juni 1969.

lung von 22 Patienten, die an einer Herpes-Keratitis erkrankt waren, mit Poly-I:C. Bei 17 von ihnen konnte ein guter therapeutischer Effekt erzielt werden. Die größten Schwierigkeiten, die einer klinischen Anwendung von Interferon-Induktoren entgegenstehen, sind einmal die bereits besprochene refraktäre Phase und zum anderen die erhebliche Toxizität der meisten bisher bekannten Induktoren.

Die klinische Anwendung von Interferon selbst ist deshalb problematisch, weil es sehr schwer ist, ausreichende Mengen von menschlichem Interferon darzustellen.

Seit der Entdeckung des Interferons durch *Isaacs und Lindenmann* sind 13 Jahre vergangen. In dieser Zeit sind zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen worden. Der Vorgang der Interferon-Induktion auf molekularer Ebene ist aber ebenso wie die Art und Weise der Interferonwirkung noch in vielen Punkten unklar. Ein anderes Ziel zukünftiger Arbeit wird die weitere Reinigung von Interferon sein, um die chemische Zusammensetzung untersuchen zu können. *Vilcek*<sup>[126]</sup> hat kürzlich eine interessante Möglichkeit diskutiert: Es könnte u.U. möglich sein, die Bildung von TIP mit anderen Substanzen als mit Interferon zu induzieren.

Eingegangen am 25. August 1969 [A 761]

[126] *J. Vilcek*, siehe [17], dort. S. 111.

## Fehlordinungsverhalten von Festkörpern (Ionenkristallen und Metallen)

Von Jens Nölting<sup>[\*]</sup>

Wichtige Eigenschaften kristallisierter fester Stoffe beruhen auf den Abweichungen vom idealen Kristallbau. Die Gitterfehler lassen sich in Kristallbaufehler (Korngrenzen, Versetzungen, Verunreinigungen) und Eigenfehlstellen unterteilen. Im folgenden werden vorwiegend Probleme und Möglichkeiten zur Bestimmung der Eigenfehlordnung behandelt. Dieser im Temperaturgleichgewicht vorliegenden Fehlordnung kommt eine entscheidende Rolle bei vielen Festkörperprozessen wie Diffusion, Ionenleitung und chemischen Reaktionen in fester Phase zu.

Nach einer Einführung in die in der Physik und Chemie übliche Beschreibungsweise des Fehlordinzungszustandes sollen die wichtigsten Untersuchungsmethoden aufgeführt werden. Hierbei wird die Methode der Bestimmung von Fehlordinungsdaten aus „anomalen“ spezifischen Wärmen besonders berücksichtigt.

### 1. Allgemeines

#### 1.1. Einleitung

Ein ideal kristallisierter Festkörper, gekennzeichnet durch absolut regelmäßige und vollständige Anordnung seiner Atome in einem Kristallgitter, kommt in der Natur nicht vor. Schon für das Kristallwachstum müssen Kristallbaufehler vorhanden sein (mindestens eine Versetzung mit Schraubenkomponente). Aber

auch ein Einkristall mit einer minimalen Anzahl von Versetzungen erhält bei Temperaturerhöhung eine ansteigende Zahl von Gitterfehlern im atomaren Bereich, die man als Eigenfehlstellen bezeichnet. Sie sind dadurch charakterisiert, daß sie reversibel im Temperaturgleichgewicht auftreten: Bei Temperaturerhöhung entstehen immer mehr Fehler, bei Temperaturniedrigung nimmt ihre Zahl wieder entsprechend ab; zu jeder Temperatur liegt jeweils eine genau definierte Konzentration der Fehlstellen vor. Neben den Eigenschaften des Kristalls bestimmt also allein die Temperatur eindeutig die Konzentration dieser Gitterfehlstellen.

[\*] Priv.-Doz. Dr. J. Nölting  
Institut für Physikalische Chemie der Universität  
34 Göttingen, Bürgerstraße 50