

II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. R. M. Schmid)

### **Typ I Interferone**

### **Unterschiede der antiviralen Aktivität der Interferon alpha Subtypen**

Ines Hildegard Ingeborg Burkard

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. E. Schulte-Frohlinde  
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 06.12.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

*gewidmet meiner Mutter*

## Abkürzungsverzeichnis

AP	antiproliferative Aktivität
AS	Aminosäuren
AV	antivirale Aktivität
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIFN	Konsensusinterferon
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GTP	Guanosintriphosphat
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HLA	human leucocyt antigen
HMGI	high mobility group protein
HPLC	high-performance liquid chromatography
IFN	Interferon
IFN- R	Interferon Rezeptor
IRF	Interferon regulatorische Familie
I $\kappa$ B	Inhibitor des NF- $\kappa$ B
ISGF-3	Interferon stimulierter Genfaktor
ISRE	Interferon stimulated responsive element
Jak	Janus Kinase
mDNS	messenger Desoxyribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazolin-2-yl)-5-(3-carboxymethophenyl)-2-(4-solfophenyl)-2H-tetrazolium)
NF- $\kappa$ B	Transkriptionsfaktor
NKZ	Natürliche Killer Zellen
PRD	positiv regulatorische Domäne
rIFN	rekombinantes Interferon
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tyk	Tyrosin Kinase
VRE	virus responsive enhancer
vRNA	virale Ribonukleinsäure

## **I. Einleitung**

<b>1. Entdeckung der Interferone</b>	<b>5</b>
<b>2. Interferon alpha Subtypen</b>	<b>7</b>
<b>3. Signaltransduktion</b>	<b>8</b>
<b>4. Anwendung der Interferone</b>	<b>9</b>
<b>5. Virus Hepatitis B und C</b>	<b>10</b>
<b>6. Klinische Aspekte der Interferontherapie bei Hepatitis-B-Virus Infektion</b>	<b>11</b>

## **II. Material und Methoden**

<b>1. Beschreibung der verwendeten Plasmide</b>	<b>12</b>
<b>2. Konzentrationsbestimmung der DNS</b>	<b>14</b>
<b>3. Zellkultur</b>	<b>14</b>
<b>4. Transfektion</b>	<b>15</b>
<b>5. Messung der Luciferaseaktivität am Luminat</b>	<b>16</b>
<b>6. Proteinmessung</b>	<b>18</b>
<b>7. Zytotoxizitätstest</b>	<b>19</b>
<b>8. Berechnung der prozentualen Hemmwerte</b>	<b>21</b>
<b>9. Statistik</b>	<b>21</b>

### III. Ergebnisse

<b>1. Darstellung der durch Typ I IFN und andere Cytokine vermittelten Inhibition der Transkription eines Reporter-gen-Plasmides mit HBV Sequenzen</b>	<b>22</b>
<b>2. Optimale Dosierungen von Plasmid mit Transfektionsreagentien</b>	<b>22</b>
<b>3. Auswahl der Interferonkonzentration und der Zelllinie</b>	
<i>3.1 Dosiswirkungskurve mit IFN alpha 2b</i>	<b>24</b>
<i>3.2 Auswahl der Zelllinie</i>	<b>25</b>
<i>3.3 Wechsel der IFN Konzentrationsangaben von I.E. auf ng pro ml</i>	<b>26</b>
<b>4. Dosiswirkungskurve von IFN alpha 1 und IFN alpha 8</b>	<b>27</b>
<b>5. Zytotoxizitätstest</b>	<b>29</b>
<b>6. Vergleich der Hemmungen durch 10 verschiedene Interferone</b>	<b>31</b>
<b>7. Vergleich der Hemmungen durch Interferon in äquimolarer Konzentration</b>	<b>36</b>
<b>8. Vergleich der Hemmungen durch Interferon in Unit-Angabe</b>	<b>37</b>
<b>9. Vergleich inhibitorischer Aktivitäten durch Kombination einzelner Interferone</b>	<b>38</b>

### IV. Diskussion

<b>1. Interferongewinnung</b>	
<i>1.1. Historische Interferongewinnung</i>	<b>41</b>
<i>1.2. Herstellung rekombinanter Interferon alpha Subtypen</i>	<b>42</b>
<b>2. Nomenklatur der Interferone</b>	<b>42</b>
<b>3. Genlokalisierung der Typ I-Interferone</b>	<b>44</b>
<b>4. Molekulare und biologische Charakterisierung der Typ I Interferone</b>	
<i>4.1 Vergleich der Molekülstruktur</i>	<b>44</b>
<i>4.2 Dreidimensionale Struktur von IFN alpha 2b</i>	<b>47</b>

<i>4.3 Dreidimensionale Struktur von Consensusinterferon</i>	<b>47</b>
<i>4.4 Dreidimensionale Struktur von Interferon alpha 1 und 8</i>	<b>48</b>
<b>5. Biosynthese der Typ I Interferone</b>	<b>49</b>
<b>6. Signaltransduktion</b>	
<i>6.1 Definition</i>	<b>51</b>
<i>6.2 Interferon Rezeptor</i>	
<i>6.2.1 Chromosomale Lokalisation des Typ I Rezeptors</i>	<b>51</b>
<i>6.2.2 Molekularstruktur des Humanen Interferon Typ I Rezeptors</i>	<b>52</b>
<i>6.2.3 Rezeptorinteraktionen</i>	<b>53</b>
<i>6.3 Signaltransduktion der Typ I und II Interferone</i>	
<i>6.3.1 Die Janus Kinase</i>	<b>55</b>
<i>6.3.2 Signal transducers and activators of transcription</i>	<b>55</b>
<i>6.3.3 Die genregulatorischen Elemente</i>	<b>57</b>
<i>6.3.4 Die Kaskade der Signaltransduktion</i>	<b>57</b>
<b>7. Interferonwirkungen</b>	
<i>7.1 Interferon induzierte Proteine</i>	<b>59</b>
<i>7.2 Antivirale und antiproliferative Wirkung</i>	<b>61</b>
<i>7.2.1 Die 2'5' Oligoadenylat-Synthetase und Proteinkinase DAI</i>	<b>62</b>
<i>7.2.2 Das Mx-Protein</i>	
<i>7.2.2.1 Entdeckung des Mx-Proteins</i>	<b>64</b>
<i>7.2.2.2 Molekülstruktur des MxA Proteins</i>	<b>65</b>
<i>7.2.2.3 Modell der MxA Protein Wirkung</i>	<b>66</b>
<i>7.3 Immunmodulatorische Wirkung</i>	<b>67</b>

<b>8. Eigene Ergebnisse</b>	
8.1. Dosiswirkungskurve mit rIFN alpha 2b	68
8.2. Zytotoxizitätstest	68
8.3. Dosiswirkungskurve mit rIFN alpha 1 und 8	69
8.4. Aktivitätsverhalten der Typ I Interferone in äquimolarer Dosis	71
8.5. Das Consensus Interferon	71
8.6. Vergleich der Rezeptoraffinität und der Aktivität in der Literatur	72
8.7. Aktivitätsverhalten der Typ I Interferone bei gleicher Gabe von I.E.	72
<b><u>V. Zusammenfassung</u></b>	74
<b><u>VI. Literaturverzeichnis</u></b>	76
<b><u>VII. Lebenslauf</u></b>	87
<b><u>VIII. Danksagung</u></b>	88

# **I. Einleitung**

## **1. Entdeckung der Interferone**

1957 beschrieben Isaacs und Lindenmann erstmals eine Substanz die auf die Virusreplikation Einfluss nahm. (Isaacs, 1957) Chorionmembranzellen eines Hühnereis entwickelten nach Inkubation mit Hitze- inaktivierten Influenzaviren eine Resistenz auf eine erneute Infektion mit Lebend- Influenzaviren. Dieses Phänomen ist auf eine in den Chorionzellen produzierte Substanz, das Interferon, zurückzuführen, die die Virusvermehrung hemmt. (Pestka, 1997 a)

Bei genauerer Untersuchung zeigte sich, dass diese Substanz ein Protein ist. Die Isolierung dieser Substanz und damit auch die Erforschung der chemischen und physikalischen Eigenschaften ist erstmals 1978 gelungen. (Pestka, 1997 b)

Interferone zählen zu der Gruppe der Zytokine und sind damit ein Bestandteil des Immunsystems. Ihre Synthese erfolgt nach einem Kontakt mit Viren, Tumoren, Bakterien oder Fremdstoffen und sie entwickeln antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften. (Läer, 1998)

Entsprechend der Synthesorten und der biologischen Wirkungen, sowie chemischen Strukturen werden die Interferone eingeteilt in:

- Interferon alpha
- Interferon beta
- Interferon gamma
- Interferon tau
- Interferon omega.

Das Interferon alpha wird in weitere Subtypen unterteilt (siehe 2. Interferon alpha Subtypen). Aufgrund ihres Synthesortes werden die alpha Interferone auch als Leukozyten-Interferone bezeichnet. Das Interferon beta wird in Fibroblasten produziert. (Modrow, 1998 a) Die Interferone alpha, beta, tau und omega sind säurestabil und werden als Typ I Interferone bezeichnet.

Interferon gamma wird als säurelabiles Typ II Interferon definiert. Es wird hauptsächlich von T-Helferzellen gebildet und zeichnet sich vor allem durch seinen immunmodulierenden Effekt aus.



## Einteilung humaner Interferone

	Typ I	Typ II
Bezeichnung	$\alpha$ : Leukozyten $\beta$ : Fibroblasten $\omega$ : Trophoblasten	$\gamma$ : T-Helferzellen, Makrophagen, NKZ
Gen	kurzer Arm des Chromosom 9 keine Introns $\alpha$ : 13 Gene $\beta$ : 1 Gen $\omega$ : 5 Gene 11 Pseudogene	langer Arm des Chromosom 12 3 Introns 1 Gen
Protein	$\alpha$ : 166 AS (165 AS $\alpha 2$ ) meist nicht glykosiliert, funktional als Monomer $\beta$ : 166 AS N-glykosiliert, funktional als Dimer $\omega$ : 172 AS N-Glykosiliert	146 AS N-glykosiliert, funktional als Tetramer
Rezeptor	$\alpha/\beta$ Rezeptor; Genlokalisierung Chromosom 21	$\gamma$ Rezeptor; Genlokalisierung Chromosom 6
Biologische Aktivität	antiviral, antiproliferativ, immunmodulatorisch	immunmodulatorisch

Abb. 1: Tabellarische Übersicht über Bezeichnung, Genlokalisierung, Proteininformation, Rezeptoren und biologischer Aktivität der humanen Interferone Typ I und II (Modifiziert nach Samuel, C.E., 1991)

## **2. Interferon alpha Subtypen**

Mit der Erforschung der Interferone wurde entdeckt, dass das Interferon alpha nicht nur in einer Variante existiert, sondern bis zu 28 mögliche verschiedene Subtypen aufweist. Das humane Interferon alpha ist mit 13 Genen auf dem Chromosom 9 codiert. (Nyman,1998)

Hieraus ergibt sich die Frage, warum der menschliche Körper so viele verschiedene alpha Interferone produziert, wenn es nicht auch Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen in ihrer Wirkweise gibt. Die Frage nach der Ursache der verschiedenen Interferon alpha Subtypen konnte in anderen Studien nicht befriedigend beantwortet werden. (Pfeffer,1998)

Die unterschiedliche Wirkung einzelner Interferon alpha Subtypen auf die durch die core promoter Region gesteuerte Transkription des Hepatitis B Virus soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Die antivirale Wirkung der verschiedenen Typ I Interferone wurde an einer virusinfizierten Zelllinie mittels eines antiviralen Assays untersucht. Es wurden 8 Interferon alpha Subtypen, ein Interferon beta und in einigen Ansätzen ein Interferon gamma verwendet. Ebenso wurden Kombinationen aus verschiedenen Interferonen gegeneinander getestet.

Es wurde mit Sequenzen eines Hepatitis B Virus gearbeitet, welche die genregulatorischen Elemente beinhalten, die in ein kommerziell erhältliches Luciferase-Reporterplasmid inkloniert wurden.

Hierdurch kann die rein antivirale Wirkung ohne Beteiligung des Immunsystems beurteilt und diesbezüglich verschiedene Interferontypen verglichen werden.

### 3. Signaltransduktion

Die Regulation eukaryontischer Gene findet auf der Transkriptionsebene statt. Damit die Zelle adäquat auf Veränderungen ihrer Umwelt, zum Beispiel ein erhöhtes Angebot von Interferonen, reagieren kann, müssen diese Informationen in den Zellkern gelangen. Die Signaltransduktion beschreibt die Vermittlung von Signalen von der Plasmamembran der Zelloberfläche zum Zellkern. Es existieren unterschiedliche Signaltransduktionswege, die teils in ihrer Signalkaskade miteinander verbunden sind.

Die Signalübertragung wird durch Rezeptoren, G-Proteine, Transkriptionsfaktoren und second-messenger-Molekülen vermittelt, sowie durch Enzyme wie Kinasen, Lipasen und Phosphatasen. Die Vermittlung Zytokin-abhängiger Signale erfolgt überwiegend durch den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg (Janus-Kinase/ signal transducers and activators of transcription).

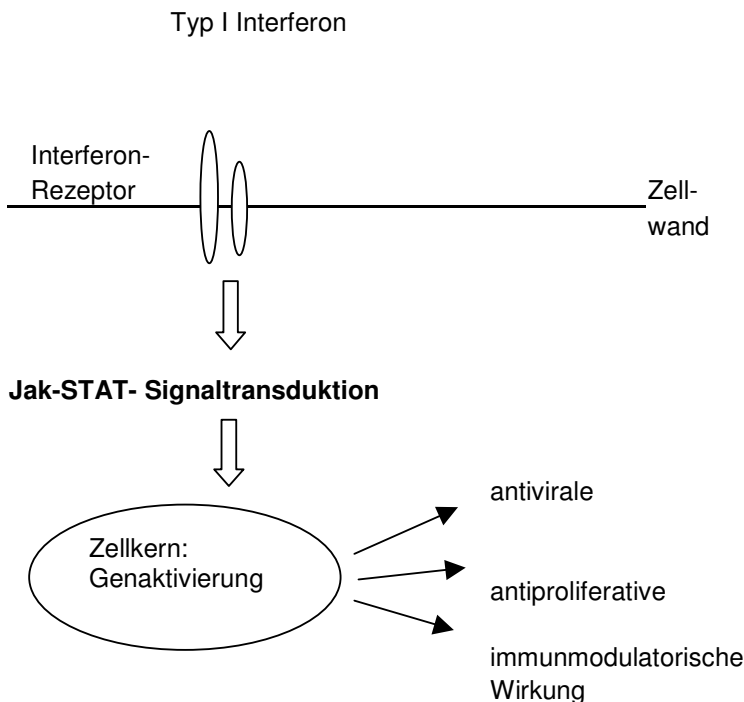


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion von Interferon Typ I und ihren Auswirkungen

#### 4. Anwendung der Interferone

Durch ihre antivirale, antiproliferative und immunregulatorische Wirkung haben insbesondere die Typ I Interferone eine therapeutische Bedeutung bei chronischer Hepatitis B und C, chronisch myeloischer Leukämie, Haarzell-Leukämie, kutanem T-Zell-Lymphom, Karposi-Sarkom und anderen Malignomen gefunden. (Eger, 1998)

Der erste therapeutische Einsatz erfolgte bei soliden Tumoren. Es wurde mit einer Präparation des natürlichen Interferon alpha gearbeitet, bei der eine deutliche Tumorregression nachgewiesen werden konnte. Seit der genetisch-technisch möglichen Herstellung der Interferone finden die rekombinanten Formen in der Forschung wie in der Klinik ihre Verwendung. (Decartis, 2002)

Speziell das Interferon alpha 2 hat durch seine Anwendung in der Therapie der chronischen Hepatitis B und C einen hohen Stellenwert erlangt.



Abb. 3: Dreidimensionale Darstellung des Moleküls von Interferon alpha 2b

## 5. Virus Hepatitis B und C

Das Hepatitis-B-Virus ist ein hepatotropes Virus, das sich in verschiedenen Formen manifestieren kann: von der akuten Infektion mit asymptomatischer selbstlimitierender Hepatitis, der fulminanten Hepatitis oder der chronischen Form. (Modrow, 1998 b)

Die chronische Form kann in eine zirrhotische Leber oder in ein Leberzellkarzinom übergehen. (Modrow, 1998 b) Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist klinisch ein hochmaligner Tumor mit rascher Progredienz und eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten. Die Inzidenz liegt weltweit bei einer Million neu aufgetretenen HCCs, wobei ein geographischer Unterschied existiert. Die Zahl der Erkrankungen sind in Sahara- Afrika und Südostasien um ein 50-faches höher als in Europa und Nordamerika. Doch auch hier stieg in den letzten Jahren die Inzidenz.

Risikofaktoren für das hepatozelluläre Karzinom sind insbesondere virale Hepatitiden.

Bei einer chronischen Hepatitis B mit HBs-Antigen Persistenz ist das Risiko auf das 200-fache erhöht. Das Risikoverhältnis bei chronischer Hepatitis C liegt noch höher. Die Geschichte der Hepatitis B ist noch relativ jung, obwohl erste Aufzeichnungen Hepatitis-Epidemien im Jahre 2000 v.Chr. nachweisen. 1947 erfolgte die Unterscheidung zwischen Hepatitis A und B, erst 1989 die Entdeckung des Hepatitis C Virus. Seit 1980 existiert ein wirksamer Impfstoff gegen Hepatitis B. In dieser Zeit wurden erste Therapieansätze mit Interferon begonnen.

Das HBV alleine ist nicht direkt hepatotoxisch. Ob es eliminiert wird oder persistiert ist von der Immunantwort abhängig. Die infizierte Leberzelle präsentiert das an das HLA Klasse I gebundene virale Antigen und aktiviert die zytotoxischen T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten können die virusinfizierten Leberzellen auch durch Aktivierung von unspezifischen humoralen Entzündungsfaktoren zerstören.

Hierin liegt ein Therapieansatz für die chronischen Hepatitis B.

## 6. Klinische Aspekte der Interferontherapie bei Hepatitis-B-Virus Infektion

Seit etwa 15 Jahren (Interferon Zulassung am 5. Juni 1986 in der USA) wird die HBV- Infektion mit Interferon alpha 2 behandelt. (Pestka, 1997 b) Eine komplette Eradikation des Hepatitis B Virus ist nicht möglich, doch bei 20 bis 30 Prozent der Patienten kann eine Serokonversion erreicht werden. (Modrow, 1998 b; Liaw, 2002) Hierbei kann das HBe-Antigen nicht mehr nachgewiesen werden, dafür das Anti- HBe.

In Deutschland ist das einzig zur der Therapie der chronischen Hepatitis B zugelassene Medikament das Interferon alpha 2a und 2b. (Niederau, 1996) Andere antivirale Medikamente wie das Lamivudin oder Famciclovir sind noch Gegenstand klinischer Studien.

Die Indikation für eine Therapie mit Interferonen ist streng. Neben der niedrigen Ansprechrate treten bei der Interferontherapie viele Nebenwirkungen auf und die Kosten sind hoch. (Leung, 2002) Für die Patienten sehr beeinträchtigende Symptome sind Fieber, Myalgien, Cephalgien, gastrointestinale Nebenwirkungen und Lokalreaktionen an der Injektionsstelle. Thrombo- und Leukozytopenien stellen ernste Komplikationen dar. Selten kommt es zu neurotoxischen Nebenwirkungen wie z.B. Depressionen, Geschmacksstörungen, Verwirrtheit, Gedächtnisstörungen, Schwindel, Parästhesien, Polyneuropathien. Es kann weiterhin zu Exazerbation einer Autoimmunerkrankung, zur Induktion von Autoantikörpern und zu einer hepatotoxischen Reaktion kommen.

Absolute Kontraindikation einer Interferontherapie besteht bei autoimmunen Hepatitiden und Thyreoditiden, dekompensierter Leberzirrhose, Leberzellkarzinom, Immunsuppression, Schwangerschaft, Thrombo- und Leukozytopenien, aktuelle Psychosen oder Depressionen.

Eine eindeutige klinische Indikation haben nicht zirrhotische Patienten mit einer chronisch aktiven Hepatitis. (Leung, 2002)

Die Therapie bestehend aus subkutanen Injektionen von mindestens 5-6 Millionen I.E. Interferon alpha dreimal pro Woche sollte sechs Monate betragen. Tritt eine HBe-Ag Serokonversion vorher auf, sollte die Therapie zwei Monate über die Serokonversion hinaus gehen. (Hopf, 1997)

## II. Material und Methoden

### 1. Beschreibung der verwendeten Plasmide

Die Transfektionen wurden mit einem Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid mit Hepatitis-B-Virus Sequenzen des Subtypes adw (pGL3-HBVadw6/9) und einem Kontrollplasmid (pRL-E7) durchgeführt.

Die Konstruktion des Luciferase-Reporter-Gen-Plasmids pGL3-HBVadw6/9 erfolgte durch den Vektor X, den uns freundlicherweise Herr Dr. S. Schäfer, Universität Gießen, zur Verfügung gestellt hat, mit genregulatorischen HBV-Sequenzen (nt899-nt1838) und einem kommerziell erhältlichen Firefly-Luciferase kodierten Reporterplasmid pGL3-Basic Vektor (Promega GmbH, Mannheim), dem eukaryontische Promoter und Enhancer Sequenzen fehlen. (DNS-Sequenz Bestimmung durch die Firma GATC)

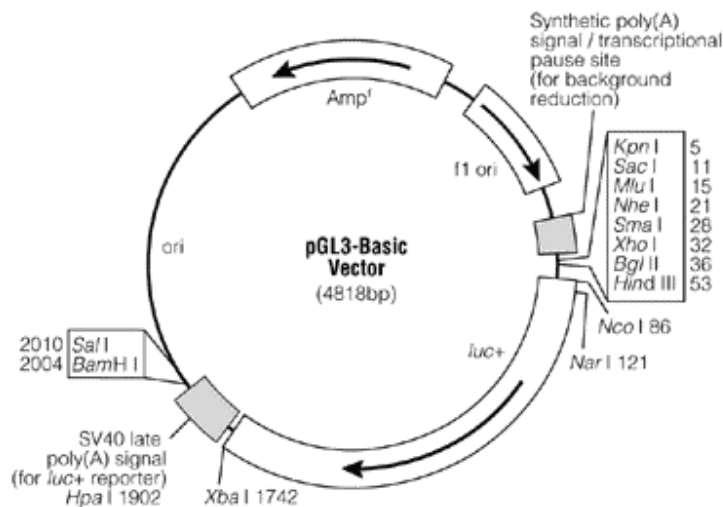


Abb. 4: Kopie des kommerziell erhältlichen pGL3-Basic Vektor der Firma Promega. Dem pGL3-Basic Vektor (4818 bp) fehlen eukaryontische Promoter und Enhancer Sequenzen. Die Expression der Luciferase kann erst nach dem Einfügen eines funktionierenden Promoters oberhalb der luc + Region erfolgen. Enhancer Elemente können oberhalb des Promoters oder in der Region von Sal I oder BamH I unterhalb des luc + Gens eingesetzt werden.

Luc + = cDNA der modifizierten Luciferase

Amp r = Ampicillinresistentes Gen in E.coli

F1 origin = origin of replication

Ori = origin of plasmid replication in E.coli

Die Pfeile im amp r und luc + Gen zeigen die Transkriptionsrichtung, der im f1 origin Gen die Richtung der ssDNA Synthese

Als Kontrollplasmid wurde einem Kontrollreporter Vektor pRL-null (Promega GmbH, Mannheim) ein 13 Basenpaar großes DNS- Fragment (identisch mit nt1791- nt1803 des HBV- Genoms mit der EMBL Datenbank Sequenz X51970) einkloniert.

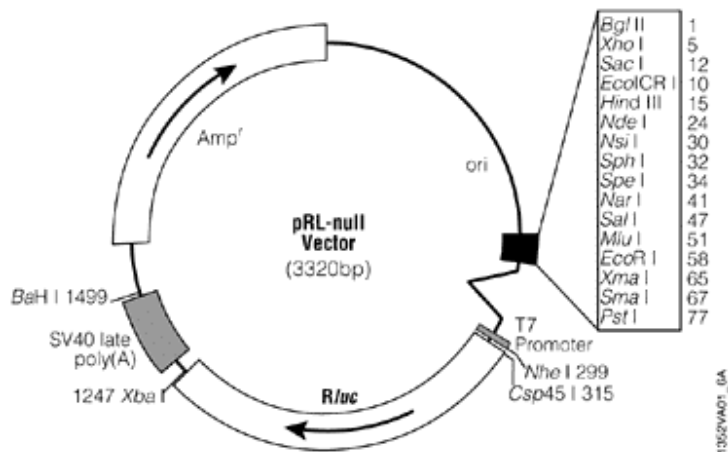


Abb. 5: Kopie des kommerziell erhältlichen pRL-null Vector der Firma Promega. Dem pRL-null Vector (3320 bp) fehlen eukaryontische Promoter und/ oder Enhancer Sequenzen oberhalb der *R/luc* Region. Dieser Vector ist zur Herstellung eines Kontroll Reporter Vectors geeignet. In Kombination mit einem beliebigen experimentellen Vector kann er co-transfiziert werden und expremiert nach Einklonierung von Promoter Elementen die Renilla Luciferase.



## **2. Konzentrationsbestimmung der DNS**

Für die Konzentrationsbestimmung von DNS- Präparationen wurde die Lösung in endotoxinfreiem TE-Puffer (Sigma) verdünnt und in Quarzküvetten bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und  $280 \text{ nm}$  im Spektralphotometer gemessen.

Zur Berechnung der Konzentration wurde der Näherungswert nach Cryer et al. verwendet.

Hierbei entspricht eine Extinktion von 1,0 bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und 1 cm Schichtdicke der Küvette etwa  $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  doppelsträngiger DNS. Durch den Vergleich der Messungen bei  $260 \text{ nm}$  und  $280 \text{ nm}$  kann man Rückschlüsse auf den Grad der Proteinkontamination und damit auf die Reinheit der DNS Präparation ziehen.

## **3. Zellkultur**

Es wird mit humanen, epithelialen Zellen der Hepatom-Zelllinie HuH 7 gearbeitet. Als Nährmedium wird Dulbecco`s modified Eagle medium mit L-Glutamin,  $4500 \text{ mg/l}$  D-Glucose, ohne Natriumpyruvat (Gibco BRL Life Technologies TM ) verwendet.

In ersten Versuchen ist auch mit Hepatomzellen der Linie Hep G2 gearbeitet worden. Diese Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco BRL Life Technologies TM) gezüchtet.

Das Medium ist pro  $500 \text{ ml}$  mit  $50 \text{ ml}$  inaktiviertem fetalen Kälber Serum (FCS) ( Sigma) und mit  $5 \text{ ml}$  einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin ( $10000 \text{ Einheiten Penicillin}$  und  $10000 \mu\text{g Streptomycin/ml}$ , als Penicillin G (Na Salz) und Streptomycin-Sulfat (Gibco BRL Life Technologies TM) versetzt.

Die Zellkultur ist adhärent und wird zwei mal wöchentlich umgesetzt. Nach dem Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (Gibco BRL Life Technologies TM) werden die Zellen für  $10 \text{ Minuten}$  mit Trypsin-EDTA (Gibco BRL Life Technologies TM) in einem Brutschrank inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wird das Trypsin durch Zugabe von Medium in seiner Aktivität gestoppt und  $5 \text{ Minuten}$  bei  $1000 \text{ Umdrehungen}$  zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium aufgeschüttelt. Von dieser Zellsuspension werden einige ml in eine Flasche mit vorgelegtem Medium gegeben und zurück in den Brutschrank bei  $37^\circ$  mit einem  $5\%$  igen  $\text{CO}_2$  - Luftgemisch gestellt.

#### 4. Transfektion

Die Zellen werden in 6-well-Platten (Falcon) mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro 2,5 ml pro well, d.h.  $8 \times 10^4$  Zellen pro ml ausgesät.

Am Tag der Transfektion soll eine Konfluenz von 40-80% erreicht werden.

Die Transfektion erfolgt 24 Stunden nach der Aussaat.

Nach Absaugen des alten Mediums mit den abgestorbenen Zellen und Waschen mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) (Gibco BRL Life Technologies TM), wird pro well 1790  $\mu$ l frisches Medium vorgelegt. Die Platten werden bis zum Zeitpunkt der Transfektion zurück in den Brutschrank gestellt.

Die Transfektionslösung wird gemäß dem Qiagen Handbook für Effectene TM Transfection Reagent (Qiagen GmbH, Hilden) hergestellt. Die für diesen Versuch optimierten Mengenangaben der Transfektionslösung pro well lauten :

	0,3 $\mu$ g	Plasmid
	2,4 $\mu$ l	Enhancer
100 $\mu$ l - 2,4 $\mu$ l (Vol. Enhancer) - 0,3 $\mu$ g (Vol. DNS)		Buffer
	5 $\mu$ l	Effectene
	600 $\mu$ l	Medium

Der Enhancer kondensiert die DNS und das Effectene umgibt sie mit kationischen Lipiden, um den Transfer der Plasmide in die Zellen zu effektivieren. Die Plasmide adw 6-9 und pRI E7 stehen in dem Verhältnis 1:1 und müssen von  $\mu$ g in  $\mu$ l umgerechnet werden.

Die Plasmide werden zusammen mit der entsprechenden Menge Enhancer in den vorgelegten Puffer gegeben und durch ein 1 Sekunden langes Vortexen gemischt. Nach 5 Minuten wird das Effectene hinzugefügt, 10 Sekunden gevortext und 10 Minuten stehen gelassen. Medium wird hinzugegeben und sofort 710  $\mu$ l dieser Transfektionslösung pro well in das vorgelegte Medium pipettiert. Durch Schwenken der Platte soll die Transfektionslösung in gleichmäßiger Konzentration auf die Zellen verteilt werden.

Nach 18 Stunden wird dieses Medium- Transfektions- Gemisch abgesaugt und die Zellen werden mit phosphatgepuffertem Kochsalzlösung gewaschen. Frisches Medium wird mit der entsprechenden Cytokinkonzentration (IFN) zu den transfizierten Zellen hinzugegeben. Hierzu

werden verschiedene Interferontypen der Firma PBL Biomedical Laboratories, New Jersey, USA von -80° C auf Eis aufgetaut und sehr rasch in das Medium und gleich darauf zu den Zellen gegeben. Um ein mehrmaliges Auftauen der Originallösung möglichst gering zu halten, (da dieses immer mit einem Wirkungsverlust des Interferons einhergeht) werden die Interferone beim ersten Auftauen mit einer 0,1 % igen bovinen Serum- Albumin- Lösung (Sigma) auf eine bestimmte Konzentration gebracht , in kleinen Mengen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

24 Stunden später erfolgt ein weiterer Mediumswechsel mit der gleichen Cytokinkonzentration wie am Vortag. 24 Stunden nach dem 2. Mediumswechsel erfolgt die Ernte, bei der unsteril gearbeitet wird. Nach dem Waschen werden die Zellen 15 Minuten mit 800 µl eines „passive Lysis Buffer“ (Promega, Mannheim) unter gleichmäßigem Schwenken lysiert. Der kommerziell erhältliche passive Lysis Buffer von Promega entspricht einem 5-fach Konzentrat und muß mit destilliertem Wasser auf ein 1-fach Konzentrat verdünnt werden. Das Lysat wird in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgenommen und sofort auf Trockeneis gegeben. In dem Zustand bei -80 °C hält sich die Aktivität der Firefly- und der Renillaluciferase mehrere Wochen.

## **5. Messung der Luciferaseaktivität am Luminat**

Um eine Bestätigung der tatsächlich stattgefundenen Transfektion zu haben und einen Nachweis der Hemmung der Cytokine auf die Plasmide zu erlangen, müssen die Aktivitäten der Firefly- und der Renilla- Luciferase gemessen werden.

Die Messungen der Luciferaseaktivitäten werden mit Hilfe der Reagentien des Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega GmbH, Mannheim) an einem Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad Wildbad) durchgeführt.

Die Reagentien werden gemäß des technischen Manuals von Promega hergestellt. 10 ml des aufgetauten Luciferase Assay Buffer II werden zu dem lyophilisierten Luciferase Assay Substrates pipettiert und resuspendiert. Zur Herstellung des Stop & Glo Reagents werden 200 µl des Stop & Glo Substrate Solvent in ein amberfarbenes Gefäß, welches das getrocknete Stop & Glo Substrate enthält, gegeben. Nach gründlichem Mischen des Solvents mit dem Substrate werden die gesamten 200 µl in ein Gefäß, in dem 10 ml des Stop & Glo Buffer vorgelegt wurden, transferiert. Das amberfarbene Gefäß wird nochmals mit 1 ml aus den 10 ml Stop & Glo Reagent ausgespült, um sicher alles Reagenz in den Buffer eingebracht zu haben. Zum Zeitpunkt der

Messung sollten die Reagentien Raumtemperatur erreicht haben.

Für die Messung müssen die Proben von -80 °C auf Eis langsam aufgetaut werden und auch in flüssigem Zustand gekühlt gehalten werden. Um eine gleichmäßige Konzentration der Luciferaseaktivitäten zu bekommen, müssen die Proben zuerst gut gemischt werden und dann in einer vorgekühlten Zentrifuge für 1 Minute bei 17000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert werden. Zur Aktivitätsbestimmung der Luciferase werden 20 µl aus dem Überstand in ein Reagenzröhrchen pipettiert.

Die Messung am Lumat LB 9507 erfolgt nach den Angaben des Gerätes, wobei ein Programm gewählt wurde, das nach dem Prinzip Injektion-Messung-Injektion-Messung arbeitet. Bei der ersten Injektion werden 100 µl des Startreagenzes Luciferase zu der Probe gegeben und nach einer Verzögerungszeit wird die Firefly Luciferase Aktivität gemessen. Mit der zweiten Injektion von 100 µl des Stop & Glo Reagenzes wird die Reaktion der Firefly Luciferase unterdrückt und die der Renilla Luciferase gestartet. Anschließend wird die Aktivität der Renilla Luciferase gemessen. Die Zeiten sind so vorgegeben, dass nach jeder Injektion, sowohl des Luciferase-Reagenzes als auch des Stop & Glo Reagenz, eine Verzögerungszeit von 2 Sekunden bis zur Messung eingehalten wird. Die Messzeit an sich beträgt 10 Sekunden. Vor der ersten Injektion erfolgt in den ersten 0,5 Sekunden eine automatische Nulleffekt Messung, um eine unzulässige Phosphoreszenz auszuschließen. Diese sollte einen Maximalwert von 50 RLU/s nicht überschreiten.

Wie der Nulleffekt, so sind auch Firefly und Renilla Luciferasen in RLU/s (relative light units / Sekunde) angegeben. Diese Maßeinheit ist definiert als gezählte Impulse geteilt durch zehn, mal einem RLU-Faktor, der Schwankungen der Kathodenempfindlichkeit verschiedener Photomultiplier ausgleichen soll.

Das emittierte Licht wird mit einem hinsichtlich hoher Empfindlichkeit und niedrigem Rauschen ausgesuchten Photomultiplier gemessen. Der spektrale Empfindlichkeitsbereich liegt zwischen 390 und 620 nm. In diesem Bereich liegen alle etablierten Anwendungen der Bio- und Chemilumineszenz. Der Photomultiplier wird als ultraschneller Photonenzähler betrieben. Die von den Lichtquanten an der Photokathode ausgelösten Photoelektronen werden über die Dynodenkette vervielfacht und lösen an der Anode einen schnellen Impuls mit der Anstiegszeit von wenigen Nanosekunden aus. Diese Impulse werden dann mit einem sehr schnellen Verstärker verstärkt. Über einen Schwellendiskriminator werden niederenergetische Einzelimpulse, die durch das Rauschen des Photomultipliers entstehen, unterdrückt. Die

Einzelimpulse werden digital gezählt, ihr Gesamtzahl ist direkt der emittierten Lichtmenge proportional. (Betriebsanleitung des Lumates LB 9507, Kapitel 1.4, Meßprinzip)

## 6. Proteinmessung

Die Proteinbestimmung wird angewandt, um eine allgemeine Hemmung oder Steigerung der Proteinsynthese der Zelle nachzuweisen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wird mit einem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gearbeitet, welcher auf der Methode nach Bradford basiert.

Die Grundlage ist die Herstellung einer Proteinstandardkurve mit einem Proteinstandard.

Es wurde ein Standard aus bovinem Serum Albumin verwendet (Proteinstandard II), da die Farbentwicklung mit Albumin signifikanter ist als mit anderen Proteinen und das Protein aus den Proben, das an das Farbreagenz gebunden wird, in diesem Farbbereich liegt. Das bei Bio-Rad erhältliche Protein liegt in lyophilisierter Form vor und muß mit 20 ml destilliertem Wasser rehydriert werden. Die Konzentration beträgt ca. 1,4 mg/ml.

Die entsprechende Menge des Proteinstandards wird mit 1x passive Lysis Buffer (5x PLB von Promega) nach einem vorgegebenen Pipettierschema verdünnt (siehe Abb. 4). Es wird 1x PLB verwendet, da die Proben in 1x PLB aufgenommen wurden und man eventuelle Reaktionen des PLB's mit dem Protein-Färbereagenz in allen Proben gleich halten will.

Die Proteinstandardkurve liegt im Bereich der Konzentrationen von 0,013 bis 0,91 µg/µl.

Die Proben werden von -80 °C auf Eis aufgetaut. Von den zentrifugierten Proben wird der Überstand abpipettiert und gevortext, um möglichst eine gleichmäßig konzentrierte Lösung zu erhalten. Hieraus werden 10 µl mit 500 µl Färbereagenz (Bio Rad Protein Assay dye Reagent) aufgefüllt. Das von Bio Rad erhältliche dye Reagent ist ein 5-fach Konzentrat und muß für die Proteinmessung mit Aqua dest. verdünnt werden.

Ebenso werden die einzelnen Standards gut vermischt und 10 µl mit 500 µl des Protein-Färbereagenz aufgefüllt. Zuletzt muß noch ein Blank, d.h. der Leerwert mit 10 µl reinem 1x PLB angefertigt werden, dem auch 500 µl Färbereagenz hinzugefügt werden. Alle Lösungen müssen vorsichtig gemischt und nach 5 Minuten bis spätestens einer Stunde gemessen werden.

Von jeder dieser hergestellten Lösungen wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. So werden 2 x 200 µl der Standards, der Proben und des Blanks in genauer Anordnung in die Vertiefungen

der 96-well Platte pipettiert.

Die Messung erfolgt an einem Microplate Reader (Bio Rad, Mod. 450) bei 595 nm. Die Absorption der einzelnen Proben kann über die Standards in die Konzentration umgerechnet werden. Um die reine Proteinkonzentration der Proben zu erhalten muß der Blank als Leerwert abgezogen werden.

Proteinstandard II	1x PLB	Konzentration
1 µl	99 µl	0,013 µg/ml
2,5 µl	97,5 µl	0,032 µg/ml
5 µl	95 µl	0,065 µg/ml
10 µl	90 µl	0,130 µg/ml
15 µl	85 µl	0,195 µg/ml
20 µl	80 µl	0,260 µg/ml
40 µl	60 µl	0,520 µg/ml
60 µl	40 µl	0,780 µg/ml
80 µl	30 µl	0,910 µg/ml

Abb. 6: Tabelle zur Erstellung der Proteinstandardkurve

## 7. Zytotoxizitätstest

Um auszuschließen, dass die Verminderung der Syntheseleistung der Zelle nicht durch eine allgemeine Zytotoxizität durch die Zytokine hervorgerufen wurden, wendet man einen Zytotoxizitätstest an.

Das CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega GmbH, Mannheim) weist die Anzahl der überlebenden Zellen bei einem zytotoxischen Versuch nach. Hierbei wird das im Assay enthaltene MTS (3-(4,5-dimethylthiazolin-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-solfophenyl)-2H-tetrazolium) zu Formazan reduziert. Dieses ruft eine Farbveränderung vom farbneutralen MTS in das farbige Formazan hervor. Das MTS wird mit Hilfe eines elektronengekoppelten Reagenzes (phenazine ethosulfate; PES) reduziert, welches vorher durch NAD(P)H, das nur in stoffwechselaktiven Zellen gebildet wird, oxidiert wurde.

Die Menge an produziertem Formazan und damit die gemessene Absorptionsänderung ist somit direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen.

Die Absorption wird an einem 96 well plate reader bei 490 nm gemessen. Zu diesem Zweck muß der gesamte Ablauf der Transfektion der Zellen und deren Behandlung mit Cytokinen in einer 96

well Platte stattfinden. Um die Versuche in den 6 well Platten mit denjenigen in den 96 well Platten miteinander vergleichen zu können, wurden die Angaben für die Zelldichte, sowie für die Mengen der Transfektionslösung von den 6 well Platten auf die 96 well Platten übertragen. Pro well wird nun 100 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von  $8 \times 10^4$  Zellen pro ml ausgesät. 24 Stunden später wird, nachdem das Medium abgesaugt und mit PBS gewaschen wurde, 50 µl frisches Medium pro well vorgelegt. Pro well setzt sich die Transfektionslösung aus je 0,015 µg adw und pRI E7 zusammen, die in 30 µl - (adw + pRI E7 ) µl Buffer gegeben werden. Die Menge an Enhancer entspricht 0,24 µl und die des Effectenes 0,5 µl. Das zu den Transfektionsreagentien zugefügte Medium mißt 50 µl. Bei der Transfektion werden 80 µl der Transfektionslösung zu den, in den wells vorgelegten, 50 µl Medium gegeben. Hier beinhaltet ein well eine Gesamtmenge von 130 µl, das als einmalige Ausnahme zählt, da ansonsten die Menge von 100 µl konstant gehalten wird. Nach 18 und nach 42 Stunden erfolgt jeweils ein Mediumswechsel mit der entsprechenden Cytokinkonzentration.

Zu dem Zeitpunkt, an dem die Ernte beginnen würde, startet nun der Cytotoxizitätstest. Das CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent wird bei Raumtempertatur aufgetaut, wobei darauf zu achten ist, daß die gesamte Menge von 20 ml maximal 90 Minuten in aufgetauten Zustand ist. Es werden nun 20 µl des Reagenzes in jedes well, das noch die 100 µl Medium von dem Mediumswechsel des Vortages enthält, hinzupipettiert. Die 96 well Platte wird 3 Stunden lang in einem Brutschrank bei 37 °C in einer befeuchteten CO2 Atmosphäre inkubiert. Nach diesen 3 Stunden wird die Absorption der einzelnen wells in einem 96 plate reader gemessen. Für die Auswertung ist zu bedenken, dass auch das reine Medium - ohne Zellen - mit dem CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent eine Farbveränderung hervorrufen kann. So sollte bei jedem Ansatz auch die Absorption des Mediums mit dem Reagenz mitgemessen werden, um sie nachher als Hintergrundsabsorption von allen gemessenen Absorptionen zu subtrahieren.

Die Absorptionen, die in den wells gemessen wurden, in denen die Zellen mit keinerlei Cytokinen behandelt wurden, entsprechen 100 % Zellwachstum, d.h. 0 % Cytotoxizität. Setzt man die Absorptionen der mit Cytokinen behandelten Zellen zu der Absorption, die der 0%igen Cytotoxizität entspricht ins Verhältnis, so erhält man hieraus die jeweilige Cytotoxizität.

Die Formel zur Berechnung der Toxizität lautet :

$$\text{Toxizität einer IFN Konzentration in \%} = 100 - \frac{((\text{gemessene Absorption der mit IFN behandelten Zellen} - \text{Hintergrundsabsorption}) \times 100)}{(\text{gemessene Absorption der Kontrollzellen} - \text{Hintergrundsabsorption})}$$

## 8. Berechnung der prozentualen Hemmwerte

Die Hemmung berechnet sich aus dem Quotienten der Luciferaseaktivität der Firefly (pGL3-HBVadw6/9) durch die Luciferaseaktivität der Renilla (pRL-E7), bezogen auf Werte der Zellen, die mit keinem Zytokin behandelt wurden.

Alle Angaben der Hemmung beziehen sich auf einen Mittelwert der Hemmungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

## 9. Statistik

Bei der Auswertung wurden die Daten eines Versuches aus mindestens drei Parallelen mit Mehrfachmessungen bestimmt und in einem Mittelwert mit dem standard error of the mean angegeben. Für den Vergleich und die Analyse der Testergebnisse wurde ebenfalls ein Mittelwert mit der Standardabweichung errechnet. Die Signifikanzen wurden mit dem zweiseitige Student's t-Test berechnet, wobei ein p-Wert < 0,05 unter Berücksichtigung der Bonferroni-Holm-Korrektur als signifikant gilt.



### **III. Ergebnisse**

#### **1. Darstellung der durch Typ I IFN und andere Cytokine vermittelten Inhibition der Transkription eines Reporter-gen-Plasmides mit HBV Sequenzen**

Die inhibitorische Wirkung der verschiedenen Interferone oder Cytokine auf die Transkription wurde mit einem Reporter-gen Assay nachgewiesen. Dem kommerziell erhältlichen Firefly-Luciferase kodierten Reporterplasmid wurden die genregulatorische HBV-Sequenzen Enhancer I und II und der core-promoter eingesetzt (pGLHBVadw6/9). Die gemessene Luciferaseaktivität entspricht dabei der Genexpression des Luciferase-Reporterplasmides und damit auch der des HBV-Gens. Als Kontrolle der stattgefundenen Transfektion und der selektiven Hemmung der HBV Transkription wird ein Plasmid verwendet, dem genregulatorische Elemente fehlen (pRL E7).

#### **2. Optimale Dosierungen von Plasmid mit Transfektionsreagentien**

In Vorversuchen wurden die optimalen Konzentrationen von Effectene, Enhancer und Plasmid herausgefunden. Alle drei Reagentien können in zu hoher Konzentration toxisch auf die Zellen wirken und dadurch verfälschte Werte liefern. Die Zellen müssen jedoch mit einer größtmöglichen Konzentration an Plasmid transfiziert werden, um eine gut meßbare Firefly- und Renilla- Luciferase zu erhalten. Die Plasmidkonzentration muß in der unteren Dosisgrenze verwendet werden, um die Cytotoxizität gering zu halten.

Das Effectene Transfection Reagent Handbook von Quiagen schlägt eine Konzentration von 0,4 µg DNS pro well vor. Es wurde deshalb in einem Konzentrationsbereich von 0,15 bis 0,55 µg DNS pro well gearbeitet.

Bei der Verwendung von 0,55 µg ergaben sich konstant hohe Luciferasewerte, die bis zu einer Konzentration von 0,3 µg reproduzierbar waren. In der Dosierung von 0,15 µg waren die Werte zwar noch gut meßbar, wiesen in Wiederholungen jedoch hohe Schwankungen auf.

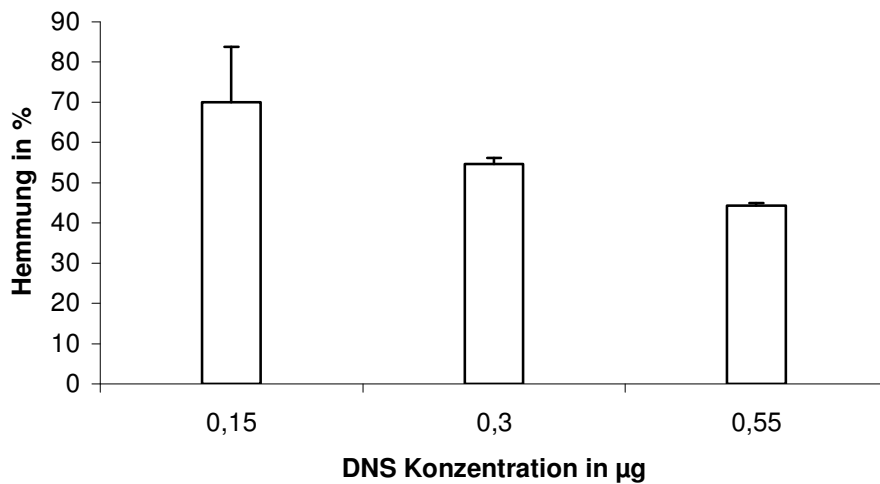


Abb. 7: Hemmung der Luciferase Aktivität in HuH7 transfizierten Zellen mit verschiedener DNS Konzentrationen der Plasmide pGLHBV Nco und pRL E7 im Verhältnis 1:1 und Interferon alpha 8 0,5 ng/ml. Dem Plasmid pGLHBV Nco fehlt der Genabschnitt, der für das HBV x-Protein kodiert.

Durch die Festlegung der DNS Konzentration auf 0,3 µg ist auch die Menge an Enhancer vorgeschrieben. DNS und Enhancer stehen im Verhältnis 1: 8 .

Im Effectene Transfection Reagent Handbook werden Kombinationen der DNS - Effectene Verhältnisse von 1: 10 bis 1: 50 vorgeschlagen. Nach Austesten der Kombinationen wurde eine möglichst geringe Dosis gewählt, die jedoch noch eine effiziente Transfektion garantiert. Das Effectene hat mit 5 µl ein Verhältnis von 1: 16,6 zur DNS.

### 3. Auswahl der Interferonkonzentration und der Zelllinie

#### 3.1 Dosiswirkungskurve mit IFN alpha 2b

Zu Beginn wurde eine Dosiswirkungskurve mit Interferon alpha 2b erstellt, um den Konzentrationsbereich der Interferone festzulegen. Bei den mit adw6/9 transfizierten Hep G2 Zellen ist ein rascher Anstieg der Hemmungen bei noch niedrigen Interferon Konzentrationen zu erkennen. Mit 30 Units pro ml (entspricht 12 ng pro ml) wird ein Hemmwert von 25 % erreicht.

Mit immer größeren Interferon Konzentrationen zeigen sich nur noch geringe, aber stetige Steigerungen der Hemmungen. So erwirken 1000 Units pro ml ( 400 ng pro ml) eine Hemmung von 40% .

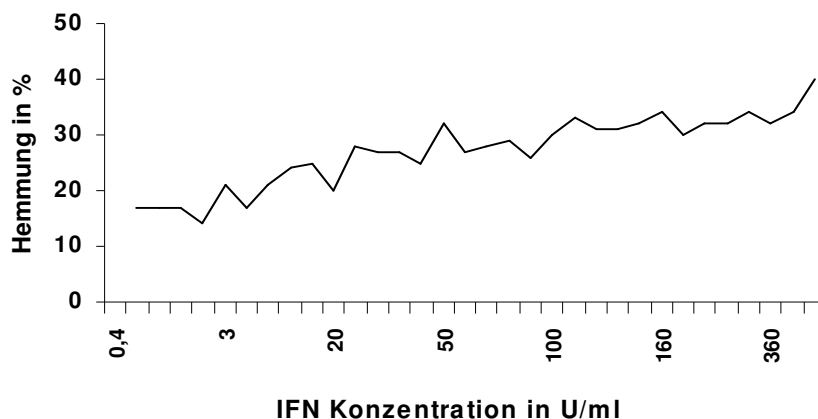


Abb. 8: Darstellung der antiviralen Aktivität des Interferons alpha 2b durch die Hemmung der Luciferaseaktivität in transfizierten Hep G2 Zellen. Die verwendeten Plasmide pGLHBV adw6/9 und pRL E7 stehen im Verhältnis 1:3

### 3.2 Auswahl der Zelllinie

Da das Hepatitis-B-Virus sich spezifisch in Hepatozyten repliziert, wurde eine Zellkultur aus der Reihe der Hepatome gewählt. Es wurden Versuche unter gleichen Bedingungen mit Zellen der Linie HuH 7 denen der Hep G2 Zelllinie gegenübergestellt.

In der mit pGLHBV adw6/9 transfizierten Hep G2 Kultur wurde mit 0,5 ng/ml Interferon alpha 8 eine deutlich geringere Hemmung von 3% gegenüber den HuH 7 Zellen mit 35% erreicht.

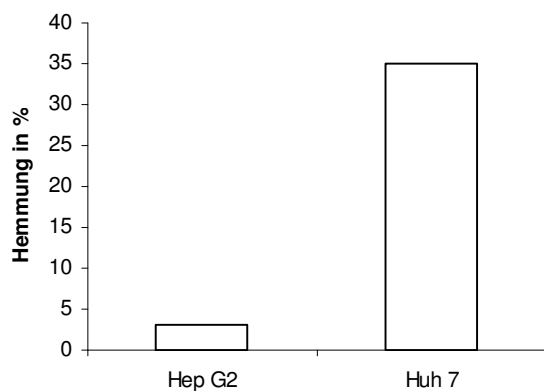


Abb. 9: Vergleich der Luciferasehemmung durch 0,5 ng/ml Interferon alpha 8 in transfizierten Zelllinien der Hep G2 gegen transfizierte Zellen der HuH 7 Zelllinie. Die Plasmide pGLHBV adw6/9 und pRL E7 stehen im Verhältnis 1:1

Zu den genregulatorischen Elementen gehören neben den Enhancer I, Enhancer II und core promoter auch das im Wildtyp enthaltene HBx-Protein mit seinem Promoter, dessen Expressionsausmaß unbekannt war. Es wurde eine HBx-minus Mutante (pGLHBV Nco) hergestellt, um mögliche Interaktionen auszuschließen.

In Transfektionen mit der HBx-minus Mutante wurde in der Hep G2 Kultur mit 0,5 ng/ml Interferon  $\alpha$ 8 eine Hemmung von 34 % erreicht, in den HuH 7 von 26 %.

Da in der Hepatomzelllinie HuH7 kein wesentlicher Unterschied zwischen der Transfektion mit dem Wildtyp oder der Minus Mutante in der Interferon Wirkung zu erkennen war, wurde festgelegt, in weiteren Versuchen mit der Zelllinie HuH7 und dem Wildtyp-Plasmid zu arbeiten.

### *3.3 Wechsel der IFN Konzentrationsangaben von I.E. auf ng pro ml*

Die biologische Aktivität der Interferone ist von PBL Biomedical Laboratories, New Jersey, USA in Units pro ml angegeben. Sie wurde durch einen antiviralen Assay bestimmt, in dem vesikuläre Stomatitis Virus infizierte MDBK Kalbszellen verwendet werden.

Um Unterschiede einzelner Interferon Subtypen zu erfassen und in diesem Versuchsaufbau ein anderes Bioassay verwendet wird, erfolgte ein Wechsel der Interferonkonzentration von I.E. auf ng pro ml.

Das Molekulargewicht der einzelnen alpha Subtypen liegt in einem Bereich um 19. In späteren Versuchen wurde mit Interferonen auch in äquimolaren Konzentrationen gearbeitet, um Wirkungsunterschiede zwischen in ng bemessenen Interferonkonzentrationen und äquimolaren Interferonkonzentrationen zu ausschließen.

#### 4. Dosiswirkungskurve von IFN alpha 1 und IFN alpha 8

Die Interferone alpha 1 und 8 wurden in einer Dosiswirkungskurve getestet.

Interferon alpha 1 wurde in den Konzentrationen 0,5; 1; 5; 10; 20 ng/ml zu den transfizierten Zellen gegeben ; Interferon alpha 8 mit 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 ng/ml.

Interferon alpha 1 zeigt einen raschen Anstieg der Hemmung in einem niedrigen Dosisbereich. Bis zu der Konzentration von 20 ng/ml erfolgt eine kontinuierliche Steigerung der Hemmung (  $42\% \pm 4,8$  bei 20 ng/ml ). Bezieht man diese Werte auf die gemessene Proteinkonzentration, so ergeben sich niedrigere Hemmwerte, die in einer Grafik jedoch den gleichen Kurvenverlauf zeigen. Diese Hemmung erreicht bei 20 ng/ml einen Wert von  $35\% \pm 10,9$ .

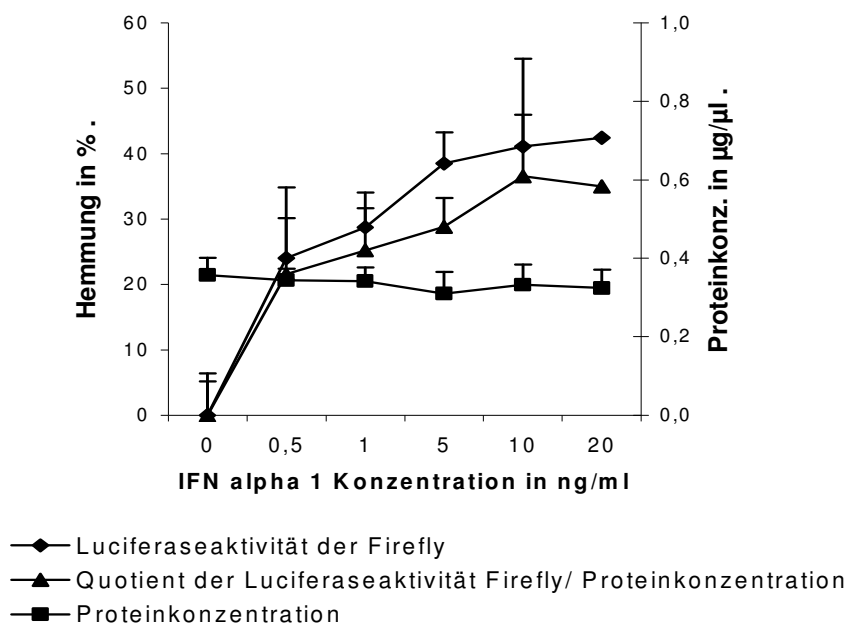


Abb. 10: Dosiswirkungskurve der antiviralen Aktivität von IFN alpha 1 gemessen an der Hemmung der Luciferaseaktivität der Firefly bzw. des Verhältnisses Firefly zu der gemessenen Proteinkonzentration

Interferon alpha 8 zeigt in seinem grafischen Kurvenverlauf der Hemmung die gleichen Aspekte wie Interferon alpha 1. Die Hemmung der Luciferaseaktivität beträgt bei 5 ng/ml  $62 \% \pm 2,0$ . Die Hemmung der Luciferaseaktivität auf die Proteinkonzentration bezogen  $46 \% \pm 2,9$ . Insgesamt zeigt Interferon alpha 8 eine deutlich stärkere Hemmwirkung als das Interferon alpha 1.

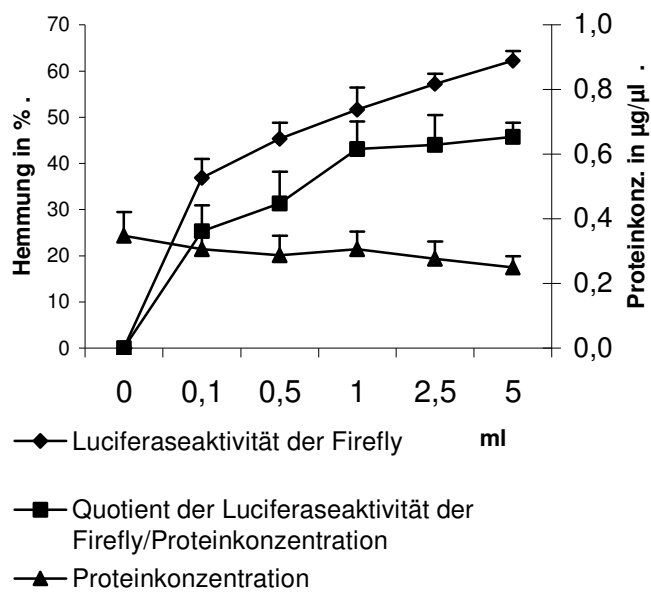


Abb. 11: Dosiswirkungskurve der antiviralen Aktivität von IFN alpha 8 gemessen an der Hemmung der Luciferaseaktivität der Firefly bzw. des Verhältnisses Firefly zu der gemessenen Proteinkonzentration

## 5. Zytotoxizitätstest

Da die Interferone an sich einen zytotoxischen, sowie einen antiproliferativen Effekt an den transfizierten Karzinomzellen hervorrufen könnten, wurde ein Zytotoxizitätstest und die Bestimmung des Proteingehalts durchgeführt.

Zur Abklärung der Toxizität wurden die Zellen mit Interferon alpha 8 behandelt. Dieses Interferon ruft unter den Interferon alpha Subtypen die stärkste Hemmung hervor. Beruht diese Hemmung auf einer toxischen Wirkung des Interferons auf die Zellen, so müsste eine deutliche Zytotoxizitätszunahme mit steigender Interferonkonzentration zu erkennen sein.

Wie in der Abb. 11 zu ersehen, ist die Toxizität in den unteren Interferonkonzentrationen zu vernachlässigen (im Durchschnitt 5 %). Ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml Interferon ist eine Toxizität von ca. 16 %  $\pm$  9 nachweisbar, die sich auch in größeren Interferondosen nur noch geringfügig erhöht (18 %  $\pm$  11 bei 10 ng/ml Interferon). Da in den vorliegenden Versuchen nur in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2 ng/ml gearbeitet wurde, ist eine Hemmung durch einen zytotoxischen Effekt auszuschließen.

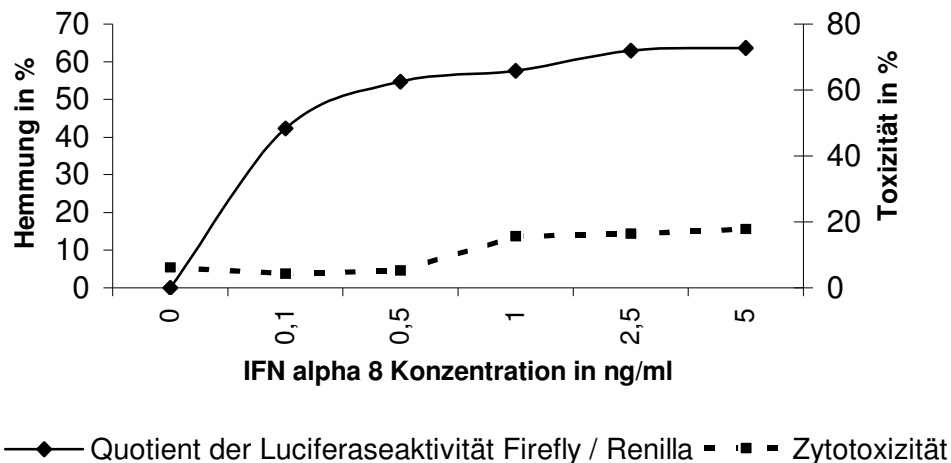


Abb. 12: Vergleich der antiviralen Aktivität und der möglichen toxischen Aktivität des IFN alpha 8 in den Dosierungen 0,1 bis 10 ng/ml. Der zytotoxische Test wurde mit einem kommerziell erwerblichen Assay durchgeführt, in dem das farbneutrale MTS Reagenz in das farbige Formazan durch stoffwechselaktive Zellen umgewandelt wird.



Die Proteinkonzentration bleibt bei ansteigender Interferondosis nahezu konstant (siehe Abb. 13). Die Annahme eines ausgeprägten antiproliferativen Effektes auf die transfizierten Zellen liegt im verwendeten Interferon Dosisbereich nicht vor.

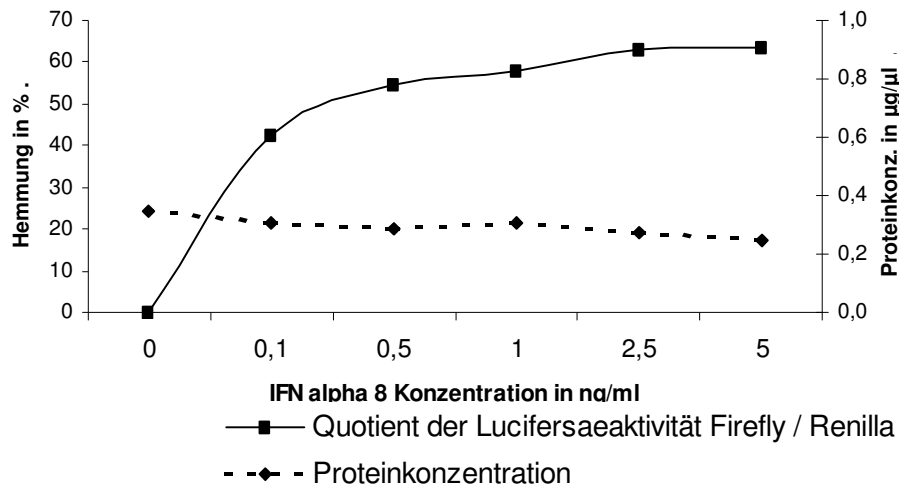


Abb. 13: Darstellung der antiviralen Aktivität des IFN alpha 8 in den Dosierungen bis zu 10 ng/ml durch die Luciferasemessung. In allen Interferonkonzentrationsbereichen zeigt sich eine konstante Proteinkonzentration.

## 6. Vergleich der Hemmungen durch 10 verschiedene Interferone

Um Unterschiede der antiviralen Wirkung der Interferon alpha Subtypen aufzuzeigen, wurden diese parallel in einem Ansatz getestet. Es wurden acht Interferon alpha Subtypen mit Interferon  $\beta$  1a und einem Interferon gamma untereinander verglichen.

Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass mit 0,025 ng/ml ein Bereich getroffen wurde, in dem eine Hemmung der viralen Aktivität schon hervorgerufen wird. Bei 0,1 und 0,5 ng/ml befindet man sich in einem mittleren Hemmbereich. Mit 2 ng/ml wird bei den meisten Interferon alpha Subtypen ein Plateauwert der Hemmung erreicht.

Alle Interferone zeigten eine Hemmung der Transkription des HBV Plasmids, bzw. damit eine Hemmung der Luciferaseaktivität. Das sich in drei Konzentrationen am schwächsten darstellende Interferon ist Interferon alpha 1. Mit 14 %  $\pm$  2,5 bei 0,1 ng/ml, 25 %  $\pm$  2,5 bei 0,5 ng/ml und 36 %  $\pm$  2,9 bei 2 ng/ml Hemmung liegt es deutlich unter der antiviralen Aktivität der restlichen getesteten Interferone. Nur in der Konzentration von 0,025 ng/ml zeigt das Interferon gamma eine schwächere Hemmwirkung als das Interferon alpha 1.

Interferon alpha 8 erweist sich in allen vier Konzentrationen als der potenteste Subtyp der alpha Interferone. Die Hemmungen von 31 %  $\pm$  2,6 bei 0,025 ng/ml, 43 %  $\pm$  1,3 bei 0,1 ng/ml, 54 %  $\pm$  2,4 bei 0,5 ng/ml und 60 %  $\pm$  1,3 bei 2 ng/ml werden nur von Interferon  $\beta$  1a überschritten.

In der Konzentration von 0,025 ng/ml liegen zwischen Interferon alpha 1 und 8, in aufsteigender Reihenfolge, Interferon alpha 14, 21, 5, 2b, 10,  $\beta$ 1a und alpha 17. Hierbei besteht ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Interferonen alpha 1 versus 14. (siehe Abb. 14)

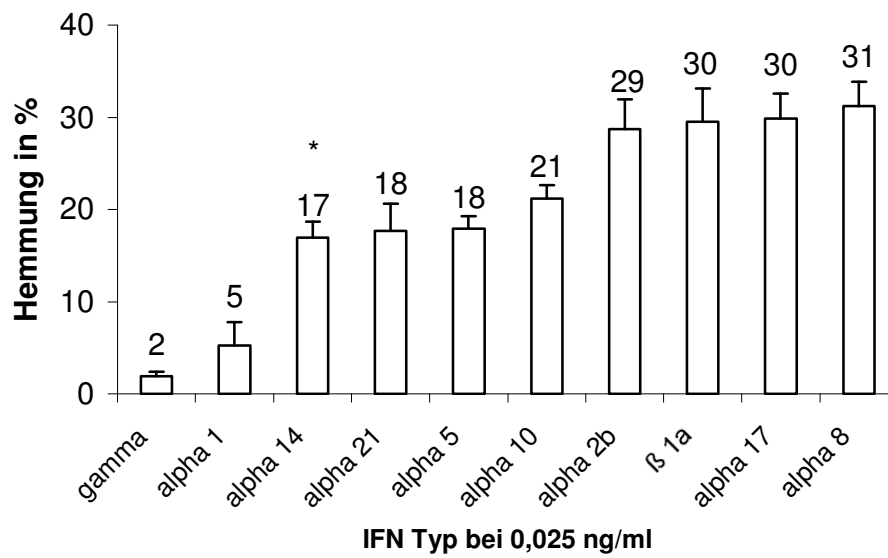


Abb. 14: Antivirale Aktivität 10 verschiedener Interferone in der Konzentration 0,025 ng/ml gemessen an der Hemmung der Luciferaseaktivität transfizierter HuH 7 Zellen.

\*= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 14 versus IFN alpha 1 ( $p < 0,05$ )

Mit Interferon alpha 1 als schwächstem und alpha 8 als potentestem Interferon in der Konzentration von 0,1 ng/ml zeigen sich auch bei den übrigen Interferensubtypen kaum Unterschiede in ihrer Stärke. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) liegt zwischen den Interferonen alpha 1 versus 21 und alpha 2b versus 17. (siehe Abb. 15)

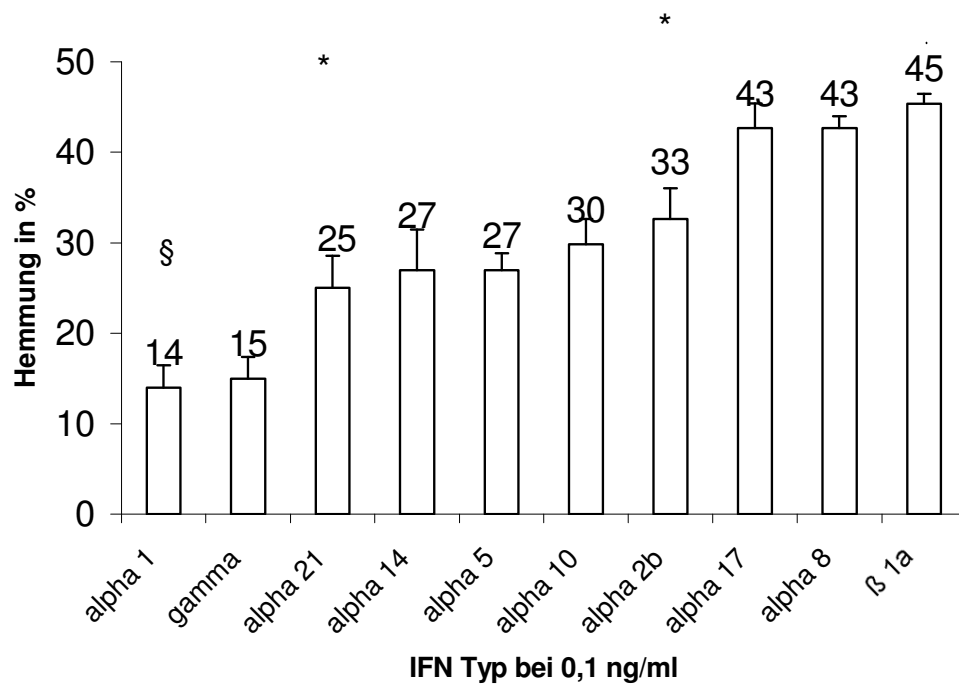


Abb. 15: Antivirale Aktivität 10 verschiedener Interferone in der Konzentration 0,1 ng/ml

§= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 1 zu Zellen, die mit keinem IFN behandelt wurden ( $p < 0,05$ )

\*= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 1 versus IFN alpha 21 ( $p < 0,05$ )

\*\*= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 2b versus IFN alpha 17 ( $p < 0,05$ )

Bei 0,5 ng/ml Interferon folgt auf Interferon alpha 1 Interferon gamma, alpha 5, 21, 14, 10, 17 und 2b. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) liegen hier zwischen Interferon alpha 1 versus 5 und alpha 17 versus  $\beta$ 1a. (siehe Abb. 16)

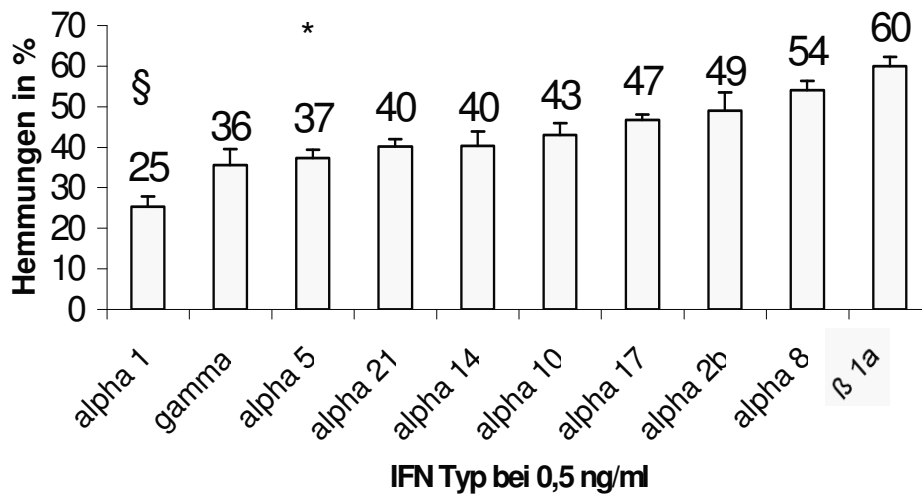


Abb. 16: Antivirale Aktivität 10 verschiedener Interferone in der Konzentration 0,5 ng/ml

§= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 1 zu Zellen, die mit keinem IFN behandelt wurden ( $p < 0,05$ )

\*= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 5 versus IFN alpha 1 ( $p < 0,05$ )

\*\*= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 17 versus IFN  $\beta$  1a ( $p < 0,05$ )

Interferone in der Konzentration 2 ng/ml weisen die gleiche Reihenfolge der ansteigenden Hemmwerte auf, wie unter 0,1 ng/ml angegeben. Die Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) beziehen sich auf die Interferone alpha 1 versus 10. (siehe Abb. 17)

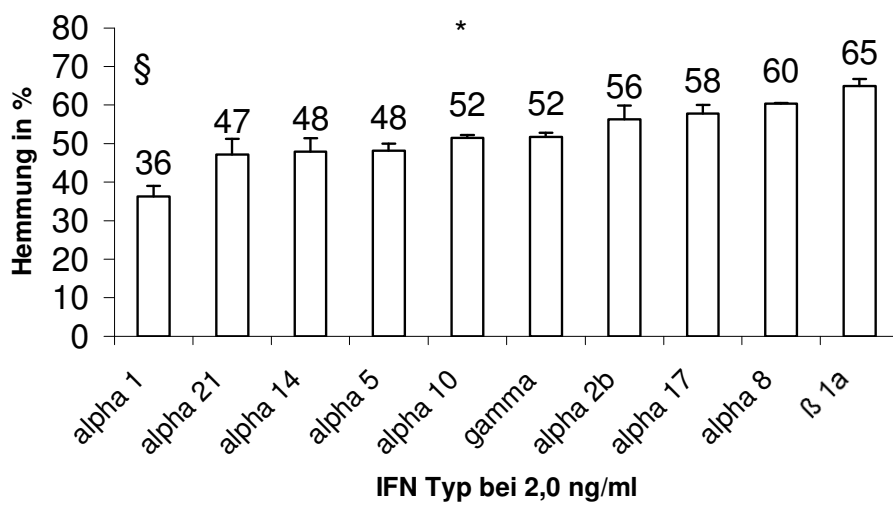


Abb. 17: Antivirale Aktivität 10 verschiedener Interferone in der Konzentration 2,0 ng/ml

§= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 1 zu Zellen, die mit keinem IFN behandelt wurden ( $p < 0,05$ )

\*= Signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 10 versus IFN alpha 1 ( $p < 0,05$ )

## 7. Vergleich der Hemmungen durch Interferon in äquimolarer Konzentration

In einem Vergleich der Hemmungen durch äquimolare Interferonkonzentration stellen sich die Hemmungen der Interferone untereinander in gleicher Reihenfolge dar. Die Molarität wurde ausgehend von 0,5 ng/ml Interferon alpha 2b, was 25,9 nm entspricht, auf 25,9 nm festgelegt. Es wurde das Interferon alpha 2b zur Umrechnung gewählt, da es zum ersten klinische Relevanz hat und zum zweiten in den experimentellen Versuchen in seiner inhibitorischen Eigenschaft in einem Durchschnittsbereich liegt. Getestet wurden Interferone, die sich in den Vorversuchen als Extreme erwiesen, wie Interferon alpha 8, gamma oder  $\beta$ 1a oder in der Therapie häufig verwendete Interferone, so z.B. Interferon alpha 2b oder das synthetische Consensusinterferon (CIFN).

Es ergibt sich die niedrigste Hemmung durch Interferon gamma mit  $29 \% \pm 1,2$ . Interferon alpha 2b liegt mit  $41 \% \pm 4,0$  unter dem Hemmungswert von Interferon alpha 8 ( $47 \% \pm 1,5$ ). Das consensus Interferon nimmt zu den alpha Subtypen gerechnet die höchste Stelle ein mit  $52 \% \pm 3,4$ . Interferon  $\beta$ 1a hemmt mit  $54 \% \pm 1,7$  am stärksten.

Consensusinterferon übt eine signifikant stärkere Hemmung als Interferon alpha 2b und alpha 8 aus. (siehe Abb. 18)

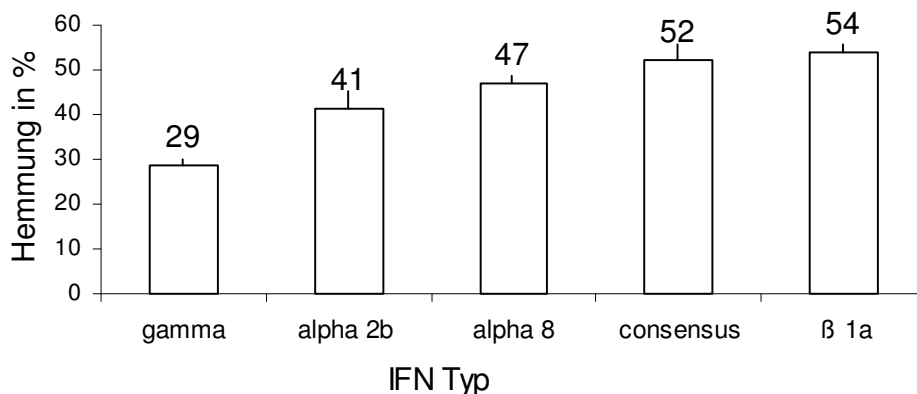


Abb. 18: Vergleich der antiviralen Aktivität verschiedener Interferone in äquimolarer Konzentration von 25,9 nm bezogen auf die Luciferaseaktivität. 25,9 nm Interferon alpha 2b entsprechen 0,5 ng/ml.

## 8. Vergleich der Hemmungen durch Interferon in I.E.-Angabe

Unter Berücksichtigung des klinischen Aspektes wurden in einem Ansatz die Dosierungen der Interferone in I.E. pro ml angegeben. Es wurden 275 I.E. verwendet, da dieses 0,5 ng Interferon alpha 8 entspricht, welches das potenteste Interferon der alpha Subtypen ist. Die untersuchten Interferone wurden nach den gleichen Vorgaben wie unter 9. ausgesucht. Zusätzlich wurde das Interferon alpha 5 verwendet, das im Unterschied zu den anderen Interferon alpha Subtypen vorwiegend in der Leber gebildet wird.

Interferon alpha 1 stellt mit  $31 \% \pm 0,3$  Hemmung den am schwächsten wirksamsten antiviralen Subtypen dar. Den Platz des potentesten alpha Subtypen nimmt mit  $51\% \pm 1,6$  Hemmung Interferon alpha 17 ein, knapp gefolgt von Interferon  $\beta$ 1a mit  $52 \% \pm 1,5$ .

Interferon alpha 8 liegt mit  $41 \% \pm 2,3$  Hemmung in der Mitte von alpha 1 und 17, wobei Interferon alpha 5 in seinem Hemmungswert zwischen alpha 1 und 8, und die Interferone alpha 2a und 2b zwischen alpha 8 und alpha 17 liegen.

Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) besteht bei alpha 1 versus alpha 8 und bei alpha 2b versus  $\beta$ 1a. (siehe Abb. 19)



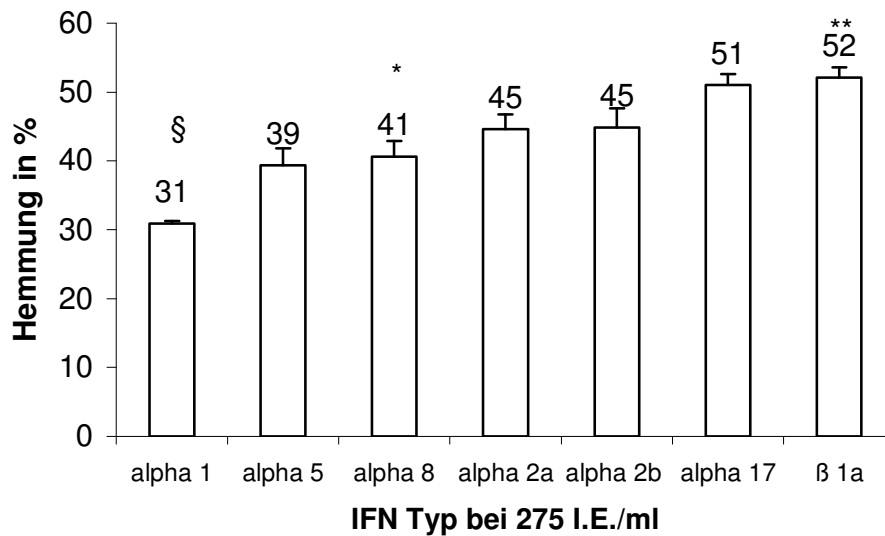


Abb. 19: Hemmung der HBV Enhancer I, II und core promoter gesteuerten Transcription durch verschiedene Interferon alpha Subtypen in gleicher I.E. Konzentration von 275 I.E./ml

§= signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch IFN alpha 1 zu den Zellen, die mit keinem IFN behandelt wurden ( $p < 0,05$ )

\*= signifikanter Hemmunterschied zwischen IFN alpha 8 und IFN alpha 1 ( $p < 0,05$ )

\*\*= signifikanter Hemmunterschied zwischen IFN alpha 2b und IFN β 1a ( $p < 0,05$ )

## 9. Vergleich inhibitorischer Aktivitäten durch Kombination einzelner Interferone

In einem Versuch Interferon β1a mit einem Interferon alpha Subtyp in Kombination zu verwenden, entstanden folgende Ergebnisse: Interferon alpha 1, 8 und β1a einzeln angewendet, ergaben bei 0,1 ng/ml Hemmungswerte von  $13 \% \pm 5,6$  ;  $40 \% \pm 7,7$  und  $46 \% \pm 6,1$  . Interferon alpha 1 mit β1a im Verhältnis 1:1 bei insgesamt 0,1 ng/ml erwirken eine Hemmung von  $37 \% \pm 5,6$ . Interferon alpha 8 mit β1a erreichen eine Hemmung von  $41 \% \pm 5,7$ .

Ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied der Hemmung besteht zwischen der Kombination alpha 1 mit β1a zu alpha 1, sowie zu β1a. Ebenso zwischen der Kombination alpha 8 mit β1a zu β1a. (siehe Abb. 20)

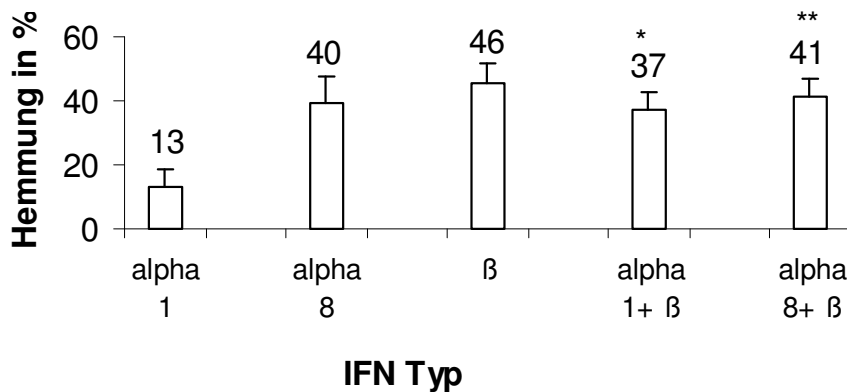


Abb. 20: Testung der Kombination von alpha IFN mit einem β IFN auf ihre transkriptionshemmende Wirkung des HBV core promoter und Enhancer I und II des pGLHBV adw6/9

\*= signifikanter Hemmunterschied zwischen IFN Kombination aus IFN alpha 1 und IFN β zu IFN alpha 1 als Einzelgabe ( $p < 0,05$ )

\*\*= signifikanter Hemmunterschied zwischen IFN Kombination aus IFN alpha 8 und IFN β zu IFN β als Einzelgabe ( $p < 0,05$ )

Kombiniert man Interferon alpha 5 mit Interferon alpha 2b, alpha 8, alpha 17 oder β 1a ergeben sich folgende Hemmwerte: die Werte bei einzeln angewendeten Interferonen betragen in der Konzentration von 0,1 ng/ml bei Interferon alpha 5  $24 \% \pm 1,5$  ;

Interferon alpha 2b  $33 \% \pm 5,0$  ; Interferon alpha 8  $36 \% \pm 5,9$  ; Interferon alpha 17  $38 \% \pm 3,6$  und Interferon β 1a  $42 \% \pm 8,2$  .

Die Kombinationen sind im Verhältnis 1:1 bei insgesamt 0,1 ng/ml. Die Hemmungen sind bei Interferon alpha 2b mit alpha 5 bei  $25 \% \pm 2,6$  ; bei Interferon alpha 8 mit alpha 5 bei  $31 \% \pm 3,7$ ; bei Interferon alpha 17 mit alpha 5 bei  $28 \% \pm 4,6$  und bei Interferon β 1a mit alpha 5 bei  $34 \% \pm 3,8$ .

Es liegen zwischen den Hemmungen durch einzeln gegebenen Interferonen und in Kombination eingesetzter Interferone keine signifikanten Unterschiede vor. (siehe Abb. 21)

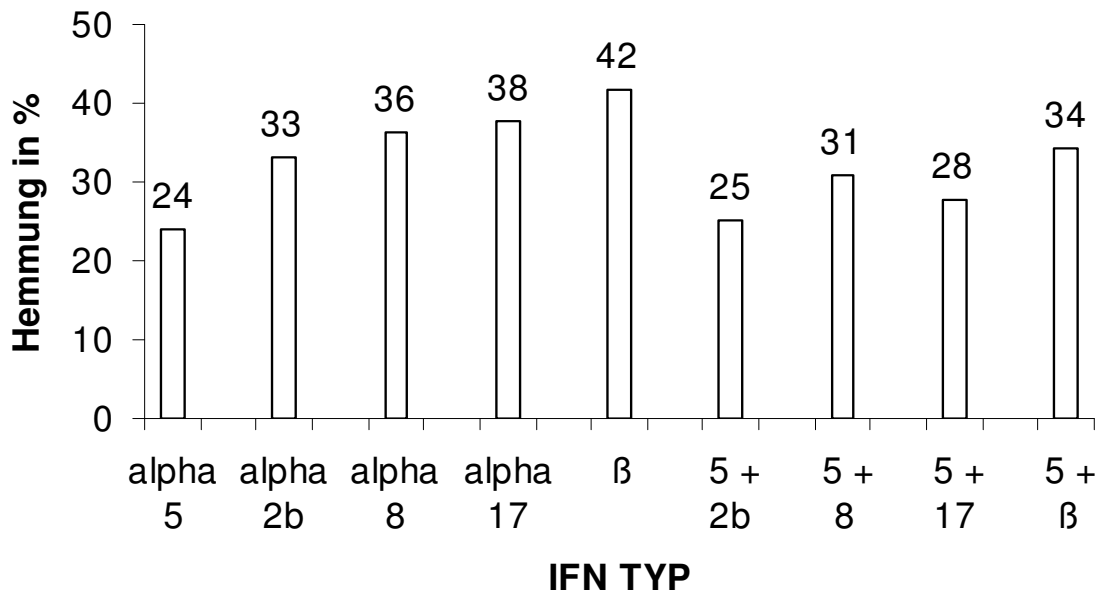


Abb. 21: Testung der Kombination von alpha IFN mit IFN alpha 5 auf ihre transkriptionshemmende Wirkung des HBV core promoter und Enhancer I und II des pGLHBV adw6/9

## **IV. Diskussion**

### **1. Interferongewinnung**

#### *1.1. Historische Interferongewinnung*

Mit der Entdeckung der Interferone wurde es in der Forschung zu einem Ziel, die Interferone mit größtmöglicher Reinheit herzustellen, um ihre biologisch und physiochemischen Eigenschaften zu charakterisieren.

Es wurden anfänglich verschiedene Verfahren zur Interferonherstellung entwickelt, doch die Produktion ausreichender Mengen an reinem Interferon erwies sich als äußerst schwierig. (Pestka, 1997 a; Pestka, 1997 b)

Zunächst wurden Interferone mittels natürlicher Quellen hergestellt, so zum Beispiel durch Isolierung von Leukozyten aus dem Blut nach Infektion mit einem Sendai- oder Newcastlevirus. Es wurden humane Leukozyten mit dem Newcastle disease Virus oder Sendai Virus für 6 bis 24 Stunden inkubiert. (Pestka, 1997 b; Familletti, 1981; Hobbs, 1982) Die Leukozyten stammten sowohl von gesunden Spendern, als auch von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, die eine vermehrte Interferonproduktion aufweisen. Wie in späteren Untersuchungen gezeigt, sind diese Interferone mit den Interferonen aus gesunden Spenderzellen identisch. (Pestka, 1997 b; Rubinstein, 1979 b)

Erst ab 1978 gelang es, die Proteinsequenz der Interferone mit Hilfe einer reversen Phase und normal Phase high-performance liquid chromatography (HPLC) darzustellen. (Rubinstein, 1979 a; Friesen, 1981; Stein, 1980) Durch Anwendung von reverser Phase- HPLC mit einer Normal-Phase Diol-Silicon-Säule, das mit n-Propanol ausgewaschen wurde, konnte eine Fraktion mit Interferonen hergestellt werden. (Pestka, 1997 b) In der Chromatographie sind mehrere Spitzen in den Fraktionen aufgefallen und man konnte sie in Subtypen, zumeist von Interferon alpha voneinander trennen. Jedoch sind in diesem Verfahren nach Cantell et al. die genaue Konzentration und der verhältnismäßige Anteil eines jeden Interferon alpha Subtyps nicht genau zu bestimmen und auch das Auftreten anderer Zytokine nicht gänzlich auszuschließen.

## *1.2. Herstellung rekombinanter Interferon alpha Subtypen*

Die rekombinante DNS Technologie ermöglicht die Herstellung eines humanen Interferons mit bekannter DNS Sequenz in großen Mengen mit hohem Reinheitsgrad.

Um die DNS Sequenz zu bestimmen, die für das Hu-Interferon kodiert, wurde als erstes die mRNA isoliert, die mit Hilfe von stimulierten Fibroblasten und Leukozyten erzeugt wurde. Hiervon wurde eine komplementäre DNS (cDNS) durch eine Gen - Library erstellt. Zur Isolierung der IFN mRNA Sequenzen enthaltenden Bakterienkolonien wurde folgende Fähigkeit ausgenutzt: die Rekombinanten wiesen bei dem mit <sup>32</sup>P markierten IFN-mRNA eine Bindungsfähigkeit auf, die bei der mRNA von nicht Interferon produzierenden Zellen nicht gegeben ist.

Dadurch erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit bei der Hybridisierung IFN-cDNS enthaltende Kolonien zu selektionieren. Nach der Elution der gebundenen mRNA wurde diese in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Mit dem Nachweis einer Interferon produzierenden Gruppe von Eizellen konnte diese Zellkolonie identifiziert werden und die daraus gewonnene cDNS durch Hybridisierung mit der IFN-mRNA charakterisiert werden.

Durch Transfektionen dieser DNS in *Escherichia coli* Zellen wurden nun monomolekulare Interferone hergestellt. Das erste auf diese Weise gewonnene Interferon war der Subtyp Interferon alpha 2, später auch Interferon beta. Alle in Bakterienkultur erzeugten Interferone sind nicht glykosiliert. (Bordens, 1997)

## **2. Nomenklatur der Interferone**

Typ-I-Interferone werden in Interferon alpha, Interferon beta und Interferon omega unterteilt. Die Interferone der alpha Klasse sind auf 14 Gene zurückzuführen. Ein Gen ist als Pseudogen bekannt, zwei weitere kodieren für das gleiche Protein. Die Einteilung der Typ-I-Interferone erfolgt nach den Richtlinien der Nomenclature Committee of the International Society for Interferon and Cytokine Research.

Genlocus	Protein	Alte Nomenklatur
IFN A1	IFN- $\alpha$ 1	IFN- $\alpha$ D
IFN A2	IFN- $\alpha$ 2a	IFN- $\alpha$ A
	IFN- $\alpha$ 2b	IFN- $\alpha$ 2
	IFN- $\alpha$ 2c	
IFN A4	IFN- $\alpha$ 4a	IFN- $\alpha$ 76
	IFN- $\alpha$ 4b	
IFN A5	IFN- $\alpha$ 5	IFN- $\alpha$ G
		IFN- $\alpha$ 61
IFN A6	IFN- $\alpha$ 6	IFN- $\alpha$ K
		IFN- $\alpha$ 54
IFN A7	IFN- $\alpha$ 7	IFN- $\alpha$ J
		IFN- $\alpha$ JI
IFN A8	IFN- $\alpha$ 8	IFN- $\alpha$ B2
		IFN- $\alpha$ B
IFN A10	IFN- $\alpha$ 10	IFN- $\alpha$ C
		IFN- $\alpha$ 6L
IFN A13	IFN- $\alpha$ 13 (identisch mit IFN- $\alpha$ 1)	
IFN A14	IFN- $\alpha$ 14	IFN- $\alpha$ H
		IFN- $\alpha$ H1
IFN A16	IFN- $\alpha$ 16	IFN- $\alpha$ O
		IFN- $\alpha$ WA
IFN A17	IFN- $\alpha$ 17	IFN- $\alpha$ I
		IFN- $\alpha$ 88
IFN A21	IFN- $\alpha$ 21	IFN- $\alpha$ F
IFN B	IFN- $\beta$	
IFN W1	IFN- $\omega$	

Abb. 22: Tabellarische Aufstellung der Typ I Interferone nach Genlocus und Protein (Nomenclature Committee of the International Society for Interferon and Cytokine Research)

### **3. Genlokalisierung der Typ I Interferone**

1982 konnten mit Hilfe der somatischen Mensch-Maus Hybride die Gene der Typ I Interferone auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 lokalisiert werden (Chromosom9p22 - p13). Es konnten für die humanen Typ I Interferone 15 tatsächliche Gene (13 Interferon alpha Subtypen, je ein Interferon beta und Interferon omega ) und 11 Pseudogene nachgewiesen werden. (Shows,1982) Die Pseudogene zeichnen sich durch Stop codons oder Deletionen bzw. Insertionen aus, die zu einem Abbruch ihrer Genexpression führen.

Allen Typ I Interferon Genen fehlen Introns. Innerhalb von 400 kb lassen sich alle 26 Gene lokalisieren, wobei 20 im distalen Bereich des Chromosomenarms gruppiert sind, die restlichen eher proximal. Auffällig ist eine größere Homologie der distalen Gene und Pseudogene im Gegensatz zu den proximal gelegeneren, was für ein jüngeres genetisches Alter spricht. (Brack, 1981)

### **4. Molekulare und biologische Charakterisierung der Typ I Interferone**

#### *4.1 Vergleich der Molekülstruktur*

Interferon alpha und beta werden als säurestabile Proteine bezeichnet. Typ I Interferone haben eine Länge von 165-173 Aminosäuren, die teilweise glykosiliert sind. Das Interferon beta weist in seiner Struktur die stärkste Glykosilierung auf. In ihrem serologischen Verhalten weisen sie Ähnlichkeiten auf, was auf eine Sequenzhomologie der Typ I Interferone bis zu 50% zurückzuführen ist. (Modrow, 1998 a)

Interferon alpha besteht, bis auf die alpha 2 Subtypen mit 165 Aminosäuren, aus 166 Aminosäuren. Sie weisen untereinander eine Übereinstimmung von 78 - 95 % in ihrer Aminosäuresequenz auf, wobei 76 der 166 Aminosäurepositionen hochkonserviert sind. (Kontsek, 1994)

Das Consensusinterferon (CIFN) ist ein synthetisch erzeugtes Interferon. Seine Aminosäuresequenz ist durch den Vergleich der bei natürlichen Interferonen am häufigsten vorkommenden Aminosäuren in jeder einzelnen Aminosäureposition festgelegt worden. Zu Interferon omega weist das CIFN eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 70% auf.

AS Pos.	Interferon			
	alpha 2	alpha 1	alpha 8	CIFN.
1	C	C	C	C
	D	D	D	D
	L	L	L	L
	P	P	P	P
	Q	<b>E</b>	Q	Q
	T	T	T	T
	H	H	H	H
	S	S	S	S
	L	L	L	L
10	G	<b>D</b>	G	G
	<b>S</b>	N	N	N
	R	R	R	R
	R	R	R	R
	<b>T</b>	<b>T</b>	A	A
	L	L	L	L
	<b>M</b>	<b>M</b>	I	I
	L	L	L	L
	L	L	L	L
	A	A	A	A
20	Q	Q	Q	Q
	M	M	M	M
	<b>K</b>	R	R	R
	I	I	I	I
	S	S	S	S
	L	P	P	P
	F	<b>S</b>	F	F
	S	S	S	S
	C	C	C	C
30	L	L	L	L
	K	<b>M</b>	K	K
	D	D	D	D
	R	R	R	R
	H	H	H	H
	D	D	D	D
	F	F	F	F
	G	G	G	G
	F	F	<b>E</b>	F
	P	P	P	P
40	Q	Q	Q	Q
	E	E	E	E
	E	E	E	E
	F	F	F	F
	D	D	D	D
	G	G	<b>D</b>	G
	N	N	<b>K</b>	N
	Q	Q	Q	Q
	F	F	F	F
	Q	Q	Q	Q
50	K	K	K	K

AS Pos.	Interferon			
	alpha 2	alpha 1	alpha 8	CIFN.
	A	A	A	A
	<b>E</b>	<b>P</b>	Q	Q
	<b>T</b>	A	A	A
	I	I	I	I
	<b>P</b>	S	S	S
	V	V	V	V
	L	L	L	L
	H	H	H	H
	E	E	E	E
60	M	<b>L</b>	M	M
	I	I	I	I
	Q	Q	Q	Q
	Q	Q	Q	Q
	<b>I</b>	<b>I</b>	T	T
	F	F	F	F
	N	N	N	N
	L	L	L	L
	F	F	F	F
	S	<b>T</b>	S	S
70	T	T	T	T
	K	K	K	K
	D	D	D	D
	S	S	S	S
	S	S	S	S
	A	A	A	A
	A	A	A	A
	W	W	L	W
	D	D	D	D
	E	E	E	E
80	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	S
	L	L	L	L
	L	L	L	L
	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	E
	K	K	<b>E</b>	K
	F	F	F	F
	Y	Y	Y	Y
	T	T	<b>I</b>	T
	E	E	E	E
	L	L	L	L
90	Y	<b>C</b>	<b>D</b>	Y
	Q	Q	Q	Q
	Q	Q	Q	Q
	L	L	L	L
	N	N	N	N
	D	D	D	D
	L	L	L	L
	E	E	<b>S</b>	E
	A	A	C	A
	C	C	C	C
100	V	V	V	V



<i>Interferon</i>					<i>Interferon</i>				
<i>AS Pos.</i>	<i>alpha 2</i>	<i>alpha 1</i>	<i>alpha 8</i>	<i>CIFN</i>	<i>AS Pos.</i>	<i>alpha 2</i>	<i>alpha 1</i>	<i>alpha 8</i>	<i>CIFN</i>
101	I	<b>M</b>	<b>M</b>	I		K	K	K	K
	Q	Q	Q	Q		Y	Y	Y	Y
	<b>G</b>	E	E	E		S	S	S	S
	V	<b>E</b>	V	V		P	P	<b>S</b>	P
	G	<b>R</b>	G	G		C	C	C	C
	V	V	V	V	140	A	A	A	A
	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>I</b>	E		W	W	W	W
	E	E	E	E		E	E	E	E
	T	T	<b>S</b>	T		V	V	V	V
110	P	P	P	P		V	V	V	V
	L	L	L	L		R	R	R	R
	M	M	M	M		A	A	A	A
	<b>K</b>	N	<b>Y</b>	N		E	E	E	E
	<b>E</b>	V	<b>E</b>	V		I	I	I	I
	D	D	D	D	150	M	M	M	M
	S	S	S	S		R	R	R	R
	I	I	I	I		S	S	S	S
	L	L	L	L		F	<b>L</b>	F	F
	A	A	A	A		S	S	S	S
120	V	V	V	V		L	L	L	L
	<b>R</b>	K	K	K		S	S	S	S
	K	K	K	K		T	T	<b>I</b>	T
	Y	Y	Y	Y		N	N	N	N
	F	F	F	F		L	L	L	L
	Q	<b>R</b>	<b>R</b>	Q	160	Q	Q	Q	Q
	R	R	R	R		E	E	<b>K</b>	E
	I	I	I	I		<b>S</b>	R	R	R
	T	T	T	T		L	L	L	L
	L	L	L	L		R	R	<b>K</b>	R
130	Y	Y	Y	Y		<b>S</b>	R	<b>S</b>	R
	L	L	L	L		K	K	K	K
	<b>K</b>	T	T	T	166	E	E	E	E
	E	E	E	E					
	K	K	K	K					

Abb.23 : Vergleich der Aminosäuresequenzen von Interferon alpha 2, alpha 1, alpha 8 und Consensusinterferon. Die divergierenden Aminosäuren sind im Fettdruck abgebildet.

#### *4.2 Dreidimensionale Struktur von Interferon alpha 2b*

Die zweidimensionale Struktur der Interferone alpha charakterisieren zwei Disulfidbrücken zwischen Cys-1: Cys-99 und Cys-29: Cys-139, bzw. zwischen Cys-1: Cys-98 und Cys-29: Cys-138 bei den Interferon alpha 2 Subtypen. (Walter, 1997)

Mit den ersten kristallographischen Strukturanalysen von murinem Interferon beta, später auch von humanen Interferon alpha 2b, 1 und 8 wurde gezeigt, dass die Interferone durch ihre fünf Helices zu den globulären Proteinen gerechnet werden. (Walter, 1997; Radhakrishnan, 1996)

Mit der Bezeichnung der fünf alpha Helices A-E ergibt sich durch die Verbindung der einzelnen Helices untereinander eine lange Schleife AB und drei kürzere (BC, CD, DE). Jede Helix ist in sich fast gerade, außer der Helix B, die an der Thr-69 Stelle eine Biegung von fast 70° aufweist. Durch diese räumliche Anordnung entsteht ein hydrophober Kern, dem die hydrophile Oberfläche der Helix E entgegenwirkt. Hierbei ist das N-terminale Ende der Helix E von der langen Schleife AB umgeben.

Das humane Interferon alpha 2b besitzt in der Helix C mit seinen Bindungsstellen Glu-41 und Glu-42 die Möglichkeit ein Zink-Ion zweifach zu binden. Durch die vierfach Bindungsfähigkeit des Zink-Ions kann durch ein weiteres Interferon Monomer ein Dimer gebildet werden.

#### *4.3 Dreidimensionale Struktur von Consensusinterferon*

Das Consensusinterferon unterscheidet sich vom Interferon alpha 2b in nur 19 Aminosäuren. Trotzdem werden in ihrer biologischen Aktivität und in ihrer Rezeptoraffinität Unterschiede beobachtet.

10 der 19 unterschiedlichen Aminosäuren befinden sich in dem Bereich des C-terminalen Endes des Moleküls. Untersuchungen zeigten, dass Veränderungen in dieser Region keine Auswirkung auf die biologische Aktivität oder Rezeptorbindung haben.

Eine weitere Gruppe von 3 ausgetauschten Aminosäuren befindet sich beim humanen Interferon alpha 2b im hydrophoben Kern. Zwar werden hierdurch drei Wasserstoffbindungen der Aminosäuren untereinander verschoben, doch ist diese Veränderung nicht maßgeblich für eine Strukturveränderung des Moleküls und damit die Rezeptoraffinität.

Von den restlichen 6 ausgetauschten Aminosäuren befinden sich zwei an der Helix D, die

nachweislich kein Unterschied in der Rezeptorbindung bei Consensusinterferon und Interferon alpha 2b zeigen.

3 veränderte Aminosäuren an der Helix A und C ergeben geringfügige Veränderungen der Struktur. Hierin könnte der Einfluss auf die veränderte Rezeptorbindung liegen, was aber nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Der letzte Aminosäurenunterschied liegt in dem Austausch von Leu-26 mit Pro und ist in der AB Schleife lokalisiert. Die kristallographische Struktur ist jedoch unverändert. Doch Prolin könnte verschiedene Bindungen in der äußerst beweglichen Schleife AB eingehen und hierbei den Rezeptor mit beeinflussen.

Auch könnte das Consensusinterferon als synthetisch hergestelltes, nicht natürlich auftretendes Interferon durch seine Aminosäurenveränderung antigene Eigenschaften hervorrufen. (Walter, 1997)

Insgesamt hat das Consensusinterferon im Vergleich zu Interferon alpha deutlich mehr Aminosäurehomologie mit Interferon beta.

#### *4.4 Dreidimensionale Struktur von Interferon alpha 1 und 8*

Interferon alpha 1, wie auch alpha 8 unterscheiden sich in je 28 Aminosäuren von Interferon alpha 2b. Viele dieser Unterschiede stimmen mit denen im Konsensusinterferon überein und wurden unter 4.3 diskutiert.

Für Interferon alpha 8 verbleiben noch 16 zu Interferon alpha 2b unterschiedliche Aminosäuren, wobei sich 9 an dem flexiblen C-terminalen Ende befinden. Wie in einer Untersuchung an Consensusinterferon gezeigt, bewirkt eine Veränderung in diesem Bereich keine Änderung der biologischen Aktivität bzw. die Rezeptoraffinität. Drei weitere Aminosäuredifferenzen befinden sich in der DE bzw. in der BC Schleife ohne die biologische Aktivität zu beeinflussen, wobei die zwei in der BC Schleife ausgetauschten Aminosäuren eine Strukturänderung hervorrufen.

Die restlichen vier ausgetauschten Aminosäuren stehen an exponierten Stellen und wirken auf die Rezeptoraffinität ein. Vor allem der Austausch an den Positionen 83, 86 und 89, die in der Helix C liegen, verändern die elektrostatische Oberfläche der Helix und die Aminosäuren der Position 83 und 86 gehen eine direkte Verbindung mit dem Interferon-alpha Rezeptor 1 ein. (Uzé, 1994)

Interferon alpha 1 weist 17 differente Positionen zu Interferon alpha 2b auf, wobei der große

Unterschied ihrer biologischen Aktivität letztlich auf 8 dieser 17 Positionen zurückzuführen ist. Diese befinden sich in der Helix A, der AB Schleife, Helix C und Helix D. (Walter,1997)

## **5. Biosynthese der Typ I Interferone**

Die Synthese der Interferone wird durch eine Virusinfektion oder durch Anwesenheit einer doppelsträngigen RNA stimuliert. (Dent, 1996) Auch Glykoproteine der Virionen können eine Interferonsynthese hervorrufen. (Ito, 1994)

Der Expressionsort der alpha Interferone beschränkt sich auf die Leukozyten und wenige Zellen der lymphatischen Zellreihe, die Synthese der beta Interferone scheint hingegen nicht auf bestimmte Zellen beschränkt zu sein. Die Menge und die prozentuale Verteilung der Interferon alpha Subtypen richtet sich nach ihrer Zielzelle und dem vorhandenen Stimulus. (Hiscott, 1984) In humanen peripheren Lymphozyten wird in einem in vitro Versuch nach Infektion mit einem Sendai virus hauptsächlich die mRNA der Subtypen Interferon alpha 1,2 und 4 nachgewiesen. (Nyman, 1998) In einer Lymphoblastenzelllinie (Namalwa- Zellen) nehmen die Interferone alpha 7,8 und beta diese Stellung ein.

Des weiteren findet sich ein Unterschied in dem prozentualen Anteil der exprimierten mRNA und dem Anteil des gleichen Interferons gemessen als Protein.

Interferon alpha 4 ist, trotz seiner hohen Expression der mRNA, auf dem Proteinlevel ein wenig vertretener Subtyp. Genau entgegengesetzt verhält es sich mit Interferon alpha 8. (Nyman, 1998)

In einem Ansatz von Dent und Gewert konnte in der HuH 7 Zellreihe 24 h nach der Infektionszeit weder eine Expression von Interferon alpha noch von beta nachgewiesen werden. (Dent, 1996)

So wurde auch in dieser Arbeit mit Zellen der HuH 7 Zellreihe gearbeitet, um unverfälschte Ergebnisse zu erhalten.

In der Virus induzierten Genexpression der Typ I Interferone konnten Enhancersequenzen nachgewiesen werden, die oberhalb der Transkriptionsstartsequenzen ihrer Promotern liegen. (Ryals, 1985) Da diese Sequenzen in beiden Interferongruppen konserviert sind, können beide durch ähnliche Faktoren aktiviert werden. Mit der genauen Erforschung des virus- responsive enhancer (VRE) des Interferons beta entdeckte man innerhalb dieser positive, wie auch negative regulatorische Domänen. (Goodbourn, 1985; Du, 1993; Leblanc,1990) Dies gilt ebenso für alpha Interferone, die jedoch noch weniger genau erforscht worden sind.

Zwei der positiv regulatorischen Domänen PRD I und PRD III sind hoch konserviert. In diesen Sequenzen befinden sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Interferon regulatory family (IRF), die positiv (IRF1) wie negativ (IRF2) regulatorisch auf die Interferongenexpression wirken. (Fujita, 1988; Reis, 1992) Zur maximalen virusinduzierten Genexpression müssen die Interferon regulierenden Faktoren 1,3 und 7, sowie der Interferon stimulierte Genfaktor 3 (ISGF-3) an diese Domänen binden. (Leonardo, 1989)

Die dritte positiv regulatorische Domäne PDR II ist in den Genen der Interferone alpha nicht aufzufinden. PDR II ist jedoch für die Induktion der beta Interferone wichtig, in denen es die Transcriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und HMGI(Y) bindet. Die high mobility group proteine, HMGI(Y), können die DNS biegen und erleichtern hierdurch die Bindung der nukleären Faktoren. Dies kann ein Grund der unterschiedlichen Expressionsstärke der zwei Interferongruppen sein. (Thanos, 1992)

## **6. Signaltransduktion**

### *6.1 Definition*

Mit Bindung von Interferon an einen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche der Zielzelle wird intrazellulär ein Signal an den Nukleolus gesendet, das eine selektive Genexpression bewirkt.

### *6.2 Interferon Rezeptor*

#### *6.2.1 Chromosomale Lokalisation des Typ I Rezeptors*

Versuche zeigten, dass die Sensitivität der Zellen auf Typ I Interferon in Abhängigkeit zu dem humanen Chromosom 21 standen. Die genaue Genlokalisierung des humanen Interferon alpha Rezeptor konnte auf 21q22.1 nachgewiesen werden. (Lutfalla, 1990; Epstein, 19982; Langer,1990)

Nach Transfektion mit einer modifizierten Rezeptor cDNS (hu IFN alpha R1) in Mäusezellen konnte Interferon alpha nicht mehr an diese Zellen gebunden werden. Die Vermutung, dass das humane Chromosom 21 noch andere Rezeptorkomponenten beinhaltet, wurde bestätigt. Dieser zweite Rezeptoranteil konnte in der Immunoprezipitation nachgewiesen werden. (Colamonic, 1993; Colamonic, 1992) Ein weiteres Merkmal dafür, dass der Rezeptorkomplex aus mehreren Untereinheiten bestehen muss, ist, dass Antikörper gegen eine Untereinheit (IFN- $\alpha$  R2 ) die Bindung der Typ I Interferone verhindert, Antikörper gegen die Zweite (IFN- $\alpha$  R1 ) jedoch keine Auswirkungen der Bindungskapazität zeigen.(Benoit, 1993)

### 6.2.2 Molekularstruktur des Humanen Interferon Typ I Rezeptors

Der Interferon alpha Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, wobei diese verschiedene Formen haben. Die IFN- $\alpha$  R1 Kette existiert als eine vollständige Kette IFN- $\alpha$  R1a und in einer splice-Variante, der das Exon IV und V fehlt.

Die vollständige und auch aktive Kette ist ein aus 557 Aminosäuren bestehendes Glycoprotein mit einen cytoplasmatischen Anteil aus 100 Aminosäuren und einen transmembranösen Teil, der aus 21 Aminosäuren besteht. (Lutfalla, 1995)

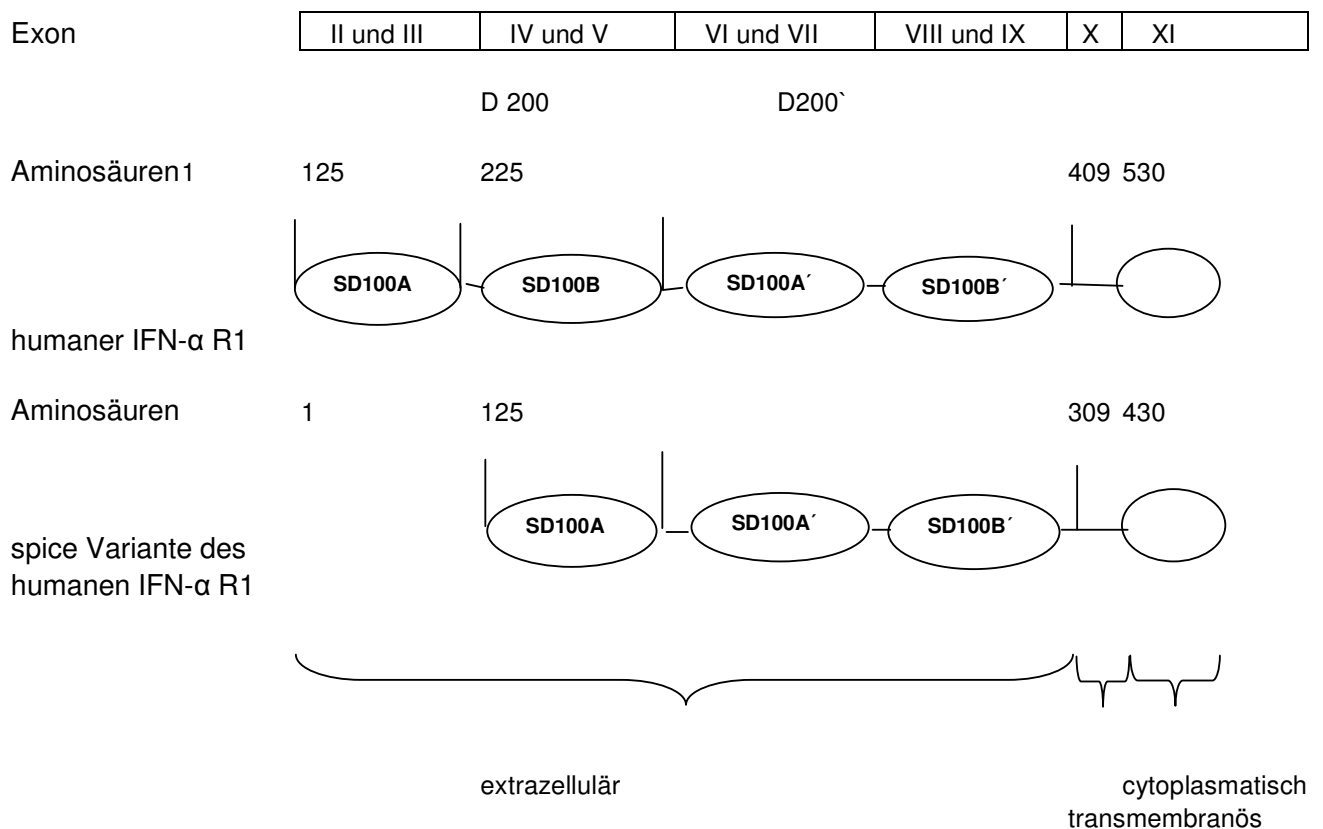


Abb. 24: schematische Darstellung der humanen Interferon alpha Rezeptor I Kette mit ihrer splice Variante (modifiziert nach Lutfalla,1995)

Die zweite Untereinheit des Interferon alpha Rezeptor2 (IFN- $\alpha$  R2) ist der eigentlich ligandenbindende Anteil des Typ I Rezeptor Komplexes. Er besteht aus 3 Isoformen: einer löslichen, einer kurzen und einer langen Form, wobei die lange Isoform mit 515 Aminosäuren als funktioneller Teil angesehen wird. (Schindler, 1995)

Die Protein Tyrosin Kinasen Tyk2 und Jak1 sind mit der IFN- $\alpha$  R1 Kette bzw. der IFN- $\alpha$  R2 Kette intrazellulär verbunden.

### *6.2.3 Rezeptorinteraktionen*

Durch die Interferon-Rezeptorbindung entsteht eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch Proteinkinasen der Jak-Familie aktiviert werden.

In Studien wurde gezeigt, dass Typ I Interferone sich den gleichen Rezeptorkomplex teilen, wohingegen das Typ II Interferon an einen eigenen bindet. (Branca, 1980)

Der Rezeptor der Typ II Interferone, der aus zwei transmembranösen Ketten besteht, wird aufgrund seiner einfacheren molekularen Struktur besser verstanden.

Die eine Kette IFN- $\gamma$  R1 bindet den Interferon  $\gamma$  Liganden, wohingegen die IFN- $\gamma$  R2 für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Durch die Ligandenbindung werden Jak 1 und 2 Kinasen durch eine Phosphorylierung aktiviert, die wiederum eine Phosphorylierung der IFN- $\gamma$  R1 Kette bewirken. Dadurch bildet das STAT 1, ebenfalls durch eine Phosphorylierung, eine Dimer, welches als Transkriptionsaktivator des Interferon  $\gamma$  Gen wirkt. (Pesta, 1997 c)



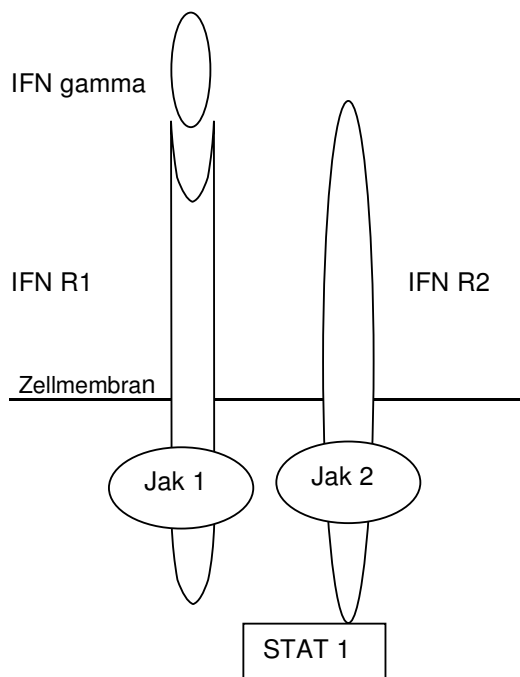


Abb. 25: vereinfachte schematische Darstellung des Interferon Typ II Rezeptors: der Rezeptor besteht aus zwei Ketten, die im cytoplasmatischen Teil Tyrosinkinase Jak 1 aufweisen. Die IFN- $\gamma$  R2 steht in Verbindung mit einem STAT Protein, das durch Phosphorylierung aktiviert mit einem zweiten STAT Protein ein Dimer bildet.

Für den Interferon Typ I Rezeptor gibt es einen ähnlichen Aufbau, doch ist er in seiner Struktur viel komplexer, wodurch sich erklären lässt, dass verschiedene Interferone an den selben Rezeptor bindend unterschiedliche Interaktionen auslösen. (Pestka, 1997 c)

Für die Typ I Interferone werden mindestens zwei Domänen diskutiert, die die Rezeptorbindung eingehen: Aminosäuresequenz 29 bis 35 und 123 bis 140. (Korn, 1994) In einem dreidimensionalen Modellversuch wurde eine hohe Interferon Typ I Rezeptoraffinität dieser Domänen erkannt. Werden diese Domänen mittels Antikörper geblockt, wird die Interferonaktivität in der Rezeptorbindung und in ihrer antiviralen Funktion behindert. (Lydon, 1985; von Gabain, 1987) Die Aminosäuresequenzen 78 bis 95 zeigten sich abstoßend gegenüber der Rezeptorregion und könnten mögliche Interferonsubtyp spezifische Bindungen eingehen. (Blatt, 1996)

### *6.3 Signaltransduktion der Typ I und II Interferone*

Interferone aktivieren unterschiedliche Signalkaskaden. Die Jak/STAT Signaltransduktion ist Schwerpunkt in der Untersuchung der biologischen Effekte der Interferone.

#### *6.3.1 Die Janus Kinase*

Durch die Bindung der Typ I Interferone an den Rezeptor werden Tyk2 und Jak1 aktiviert. Tyk2 interagiert mit dem intrazellulären Anteil der IFN- $\alpha$  R1 Kette, Jak1 mit einem Anteil der IFN- $\alpha$  R2 Kette.

Jak1 und Tyk2 werden zusammen mit Jak2 und Jak3 als die zytoplasmatischen Tyrosin Kinasen der Janus-Familie bezeichnet. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 115 und 135 kd und bis auf Jak3, das nur in hämatopoetischen Zellen expremiert wird, finden sie sich in allen Zellen. (Schindler, 1995; Ihle, 1995) Die Kinasen existieren auch an Rezeptoren gebunden, doch fehlt ihnen dort die SH Gruppe. Das carboxy-terminale Ende der Jak Kinasen weist die gleiche Domäne wie anderen Protein Tyrosin Kinasen auf mit einer zusätzlichen Pseudokinase Domäne, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Zum amino-terminalen Ende hin weist die Januskinase 5 Regionen auf, die innerhalb der Janusfamilie homolog sind, wohingegen das amino-terminale Ende unterschiedlich ist. Diese Region bindet vermutlich die Cytokinrezeptoren. (Schindler, 1995) Das Gen für Jak1 und Jak2 befindet sich auf Chromosom 1 und 9, für Tyk2 auf Chromosom 19. (Hardie, 1995 a; Hardie, 1995 b)

#### *6.3.2 Signal transducers and activators of transcription*

Die Familien der Signal transducers and activators of transcription (STAT) besteht aus 6 verschiedenen STATs, wobei für die Signaltransduktion der Interferone Typ II hauptsächlich das STAT 1, für Interferone Typ I STAT1 und 2 eine Rolle spielen.

STAT1 besteht aus zwei Isoformen, alpha und beta, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen. (Fu, 1992) Der beta Form fehlen 38 der 750 Aminosäuren am carboxy-terminalen Ende, in denen jedoch die aktive Domäne lokalisiert ist. Das STAT2 besteht aus 851

Aminosäuren.

Alle STAT Proteine sind in ihren funktionalen Domänen gleich organisiert. Die STATs aktivieren durch ihre Bindung an die DNA die Transkription. Diese Bindungsstelle befindet sich in der Mitte des Moleküls. Zwischen dieser Bindungsstelle und dem carboxy-terminalen Ende liegt eine SH2 Domäne, die die Bildung eines STAT Dimeres ermöglicht, welche für die spätere Bindung an die DNA erforderlich ist. Das carboxy-terminalen Ende, das für die DNA Bindung verantwortlich ist, ist bei den STATs unterschiedlich. Es weist jedoch immer ein Tyrosin auf, das durch Jaks phosphoryliert werden kann und damit die STAT aktiviert werden können. (Darnell, 1994) Während die Phosphorylierung des Tyrosins der STAT 1 und 2 Proteine durch Typ I Interferone in allen nicht transformierten Zellen auftritt, ist die Phosphorylierung der STAT 3,4,5 und 6 Moleküle Zelltyp spezifisch. (Rogge, 1998, Fasler-Kann, 1998)

Das hoch konservierte amino-terminale Ende verbindet STAT Dimere miteinander, die zu einer DNA Bindung führen. (Xu, 1996; Hoey, 1998)

Die Genlokalisierung der STAT1 bzw. 2 ist auf Chromosom 1 bzw. 10 des Chromosomensatzes der Maus. (Copeland, 1995)

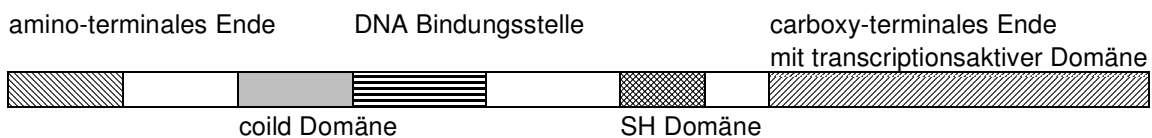


Abb. 26: Schematische Darstellung der funktionalen Domänen der STAT Proteine: das amino-terminale Ende ist hoch konserviert, im carboxy-terminalen Ende, das bei den verschiedenen STAT Proteinen unterschiedlich ist, befindet sich die Domäne die die Transkriptionsaktivierung bewirkt. In der Mitte des Moleküls befindet sich die DNA Bindungsstelle. Die SH Domäne ist für die Dimerisierung der STAT Proteine verantwortlich. (modifiziert nach Hoey, 1998)

### 6.3.3 Die genregulatorischen Elemente

Die durch die Interferone hervorgerufenen Transkription wird durch regulatorische Elemente, sogenannte ISRE (Interferon-stimulated responsive element) geregelt. Hieraus entstehen drei verschiedene Proteinkomplexe, ISGF-1,2 und 3. ISGF-3 ist der einzig durch Interferon Typ I induzierte Komplex und besteht aus dem Protein p48/ISGF-3 $\gamma$  und dem Heterodimerkomplex aus STAT1/2. Das Protein p48 zählt zu der Familie der Interferon-Gen regulatorischen Faktoren. Mit der Bindung dieses Genfaktor 3 Elements an das Promotor Gen wird die Transkription beschleunigt bzw. gestartet. (Bryan, 1997; Levy, 1988)

### 6.3.4 Die Kaskade der Signaltransduktion

Die Jak/STAT Signaltransduktionkaskade ist in sich sehr komplex. und gegenwärtig noch Mittelpunkt der Forschung. Nachfolgend ist der vereinfachte Ablauf der Kaskade erläutert.

Mit der Bindung des Interferons an den Rezeptor entsteht eine Veränderung der molekularen Struktur der Rezeptorketten, die zu einer Tyrosin-Phosphorylierungs Kaskade führt: die an die Rezeptoren gebundenen Jaks bzw. Tyks werden phosphoryliert und phosphorylieren ihrerseits Tyrosinkomplexe, die in der Rezeptorkette eingebunden sind. Das an die IFN-R1 Kette gebundene Tyk2 dient phosphoryliert als Bindungsstelle für das STAT2, welches ebenfalls durch das Tyk2 phosphoryliert wird. STAT Proteine werden durch die Bindung ihrer SH2 Domäne an das phosphorylierte Tyrosin an einer Rezeptorkette aktiviert. Durch wechselwirkende Interaktionen der aktivierten SH2 Domäne und der phosphorylierten Tyrosin Region im carboxy-terminalen Ende eines weiteren STAT Proteins entsteht ein STAT Dimer. An das rezeptorgebundene STAT2 kann nun noch das STAT1 gebunden und phosphoryliert werden. (Leung, 1995)Die STAT- Elemente lösen sich daraufhin von der Rezeptorkette und bilden sich zu Heterodimeren (STAT1/STAT2) aus. An einem Interferon Typ I Rezeptor bildet sich durch das Zusammenlagern von zwei STAT1 Proteinen ein Homodimer.

Mit der Verbindung eines Heterodimerkomplexes und dem Protein p48 entsteht der Interferon stimulierte Genfaktor 3 (ISGF-3). Dieser bindet und aktiviert damit ISRE Sequenzen bestimmter Gene und regelt damit die Expression Interferon stimulierter Gene. Gene, die keine ISRE Sequenzen aufweisen werden durch ein STAT1 Homodimer aktiviert.(Sims, 1993)

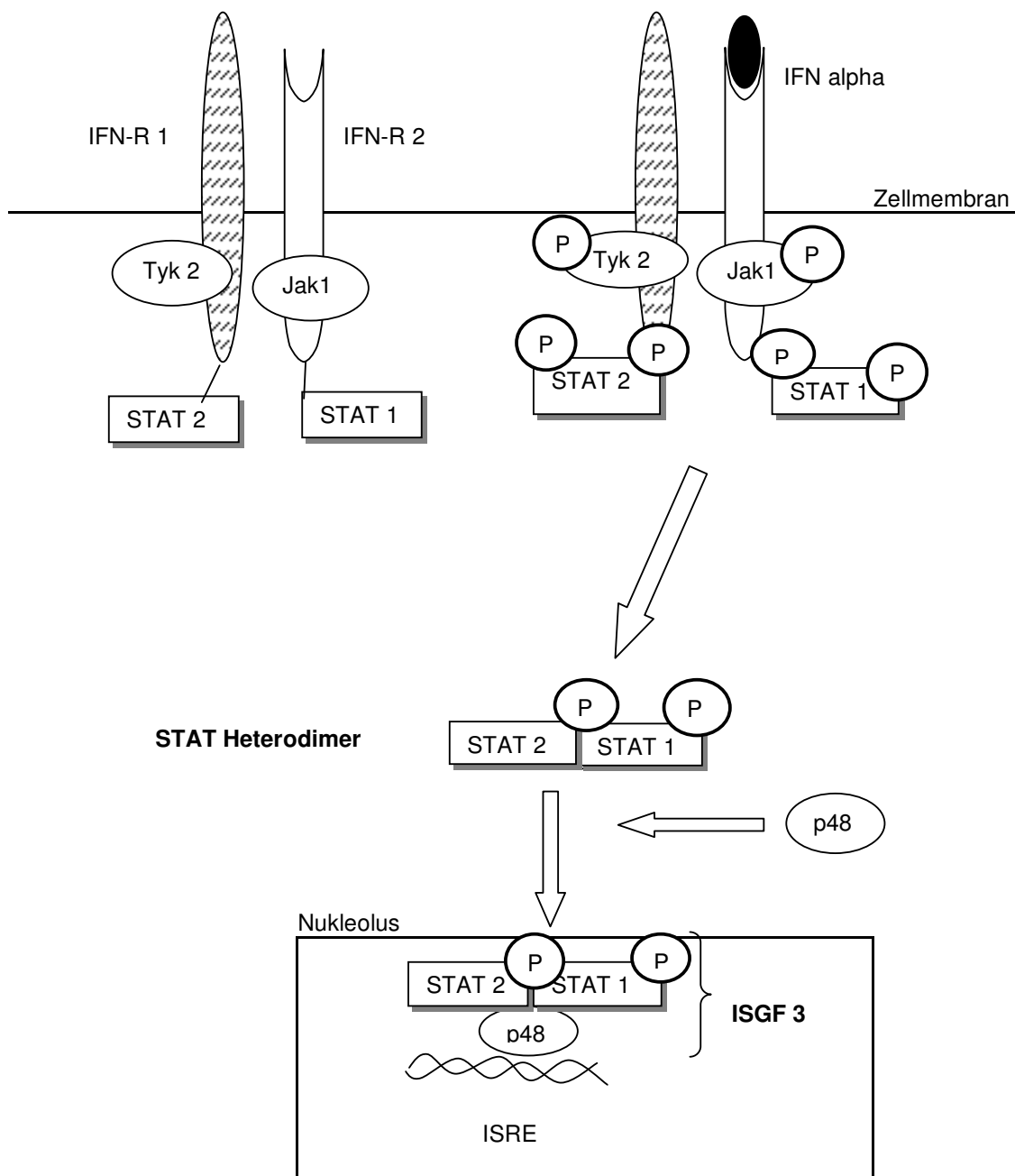


Abb. 27: vereinfachte schematische Darstellung der Signaltransduktion der alpha Interferone. Durch Anbindung des alpha Interferons an seinen Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung der Jak1 und Tyk 2 Kinasen, die wiederum die an den Rezeptor gebundene STAT Proteine phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung aktiviert bilden sich die STAT Proteine zu einem Dimer aus. Vom Rezeptor losgelöst verbindet das STAT-Dimer sich im Cytoplasma mit dem Protein p48 zu dem Interferon stimulierenden Genfaktor 3 ISGF3 . Dieser kann sich im Nucleolus an DNASEquenzen, sogenannte ISRE (IFN stimulatory response elements), binden und die Transkription starten.

Obwohl die verschiedenen STAT Moleküle durch Interferon alpha und beta aktiviert werden, scheint das auf unterschiedliche Weise zu funktionieren. STAT3 und STAT5, aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Abb. 26 nicht aufgezeigt, können nur bei einer aktiven Tyk2 phosphoryliert werden. STAT1 und STAT2 werden auch bei einer inaktiven Tyk2 an ihrem Tyrosin phosphoryliert und führen nachfolgend zu einer Geninduktion. (David, 2002)

Des Weiteren wird durch eine interferoninduzierte Proteinkinase der I $\kappa$ B, der Inhibitor der NF- $\kappa$ B, phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Alle von NF- $\kappa$ B kontrollierten Gene werden nun transkribiert. (Modrow, 1998)

Trotzdem, dass sich Interferon alpha und beta den gleichen Rezeptor teilen, zeigen sich unterschiedliche Auswirkungen. Dies zeigt sich zum Beispiel in dem Nachweis von  $\beta$ R1, einem Gen, das durch Interferon beta induziert wird, nicht aber durch alpha Interferone. (Rani, 1996) Mit Ausnahme von Interferon alpha 8, das eine schwache Induktion von  $\beta$ R1 hervorruft.

## **7. Interferonwirkungen**

### *7.1 Interferon induzierte Proteine*

Die Interferone sind in ihrer Aktivität als antiviral, antiproliferativ und immunmodulatorisch definiert. Interferone bewirken durch ihre Rezeptorbindung die Induktion neuer Proteine, die verschiedene biologische Interferonaktionen hervorrufen. Hierbei spielen auch vorbestehende zytoplasmatische Proteine oder Enzyme eine große Rolle. Die Zahl der interferoninduzierten Proteine ist weit über 30. Einige dieser Proteine aktivieren ihrerseits wieder eine Kaskade der Signaltransduktion und Genexpression. Manche Proteine werden nur von bestimmten Interferonen Subtypen gebildet, andere von Typ I wie Typ II Interferonen. (Ganes, 1992)

Bisher genauer bekannte Proteine oder Enzyme, die durch Interferone reguliert werden sind: die Proteinkinase, die 2'5'Oligoadenylat-Synthetase, die 2'5'Phosphodiesterase, das Mx Protein, HLA Antigene, das  $\beta$ -Mirkoglobulin, der TNF Rezeptor. (Dianzani, 1978; Jacobsen, 1986) Auch eine Vielzahl anderer Gene werden durch Interferone reguliert, wie zum Beispiel gewisse Onkogene, die Rezeptoren für Insulin, Transferrin und den epidermalen Wachstumsfaktor. (Samuel, 1988; Samuel, 1987)

<b>Protein</b>	<b>Induziert durch</b>	
	<b>Typ I IFN</b>	<b>Typ II IFN</b>
2,5 Oligo(A)-Synthetase	+	+
Protein (p68) Kinase	+	±
MHC Klasse I Antigen (HLA-A,B,C)	+	+
β2 Mikroglobulin		
MHC Klasse II Antigen (HLA-DR)	±	+
Indolamin 2,3-dioxygenase	±	+
Guanylat bindendes Protein	±	+
Mx Protein	+	-
IP 10	±	+
TNF- Rezeptor	±	+
IL-2 Rezeptor	-	+
GM-CFS Rezeptor	-	+
Intercelluläres Adhäsionsmolekül CD 54	-	+
Immunglobulin Fc Rezeptor	±	+

Abb. 28: Tabellarische Aufstellung der Typ I und II Interferon induzierten Proteine (modifiziert nach Meager, 2001)

Welche Rolle die einzelnen Faktoren oder Mechanismen haben und wie sie untereinander in Beziehung stehen ist nur von einigen wenigen bekannt und wird nachfolgend beschrieben. (Pestka, 1987)

## 7.2 Antivirale und antiproliferative Wirkung

Interferone können auf unterschiedliche Weise auf die Virusvermehrung einwirken. Durch verschiedene Interaktionen können sie an verschiedenen Stadien der Virusreplikation eingreifen. Zumeist wird die Translation der viralen Proteine gehemmt. Angriffspunkte sind aber auch die Transkription, die Virusreifung, bei der die Glykosylierung gestoppt wird oder die Freisetzung der Virionen. Doch nicht alle dieser Mechanismen sind gegen alle Viren effektiv. Die Hemmung der Transkription scheint beispielsweise nur gegen Influenzaviren, ein Orthomyxovirus gerichtet zu sein. (Samuel, 1988; Samuel, 1987; Jacobsen, 1986)

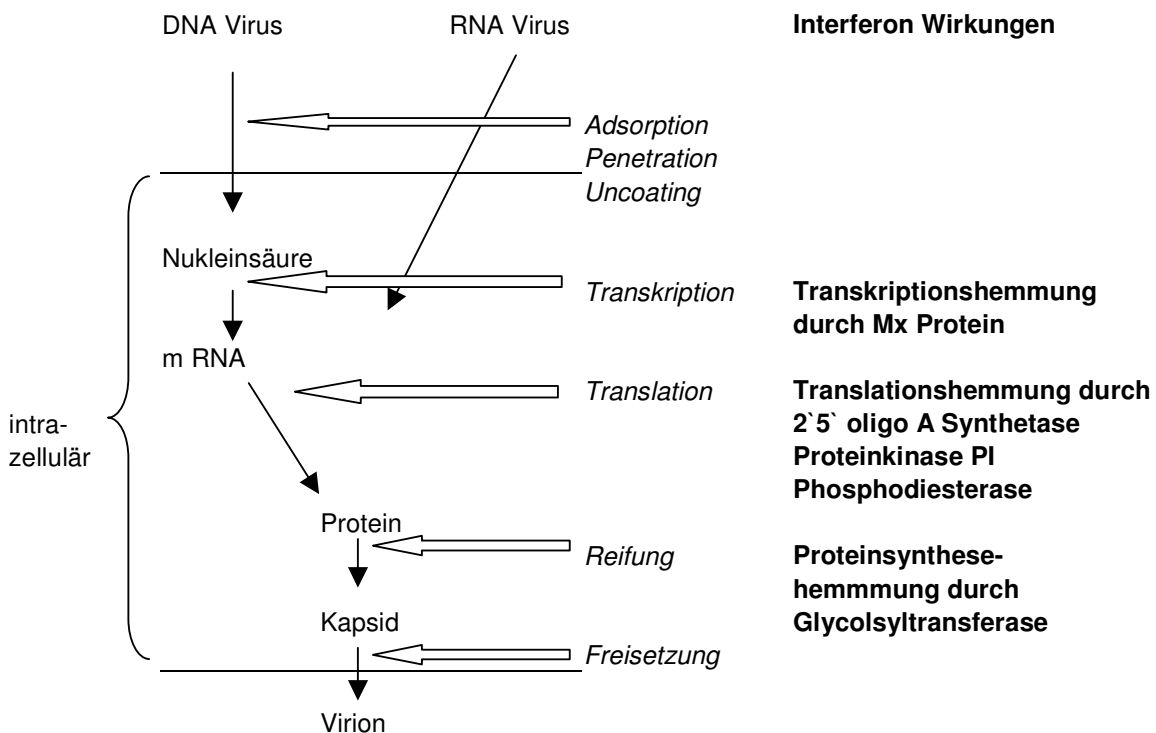


Abb.29: Mechanismen der antiviralen Wirkung durch Interferone. Durch die Induktion interferonabhängiger Proteine wird die Virussynthese an verschiedenen Stadien gehemmt.



### 7.2.1 Die 2'5' Oligoadenylat-Synthetase und Proteinkinase DAI

Zwei der am besten erforschten biochemischen Abläufe, die die Translation beeinflussen sind in der untenstehenden Abbildung dargestellt und werden im Folgenden kurz erläutert.

Zum einen hemmen sie die Proteinsynthese, indem sie die Induktion einer 2'5'-Oligoadenylatsynthetase bewirken. Durch das Vorhandensein einer doppelsträngigen RNA, wie zum Beispiel während der Virusreplikation, wird das Zellenzym aktiviert und verestert bis zu fünf ATP Reste. Diese binden sich an die RNase, welche einzelsträngige RNA abbaut. Dadurch wird die Proteinsynthese der Viren, aber auch die zelleigene gehemmt. (Pestka, 1987; Williams, 1985)

Von einigen Autoren (Coccia, 1990, Chebath, 1987, Marie, 1990) wurde beschrieben, dass unterschiedliche Formen der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase abhängig von den untersuchten Zellen existieren. Auch ihre Aktivierung ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie zum Beispiel von dem Interferon oder der Interferondosis. So ist es denkbar, dass die unterschiedlichen Enzymformen unterschiedlichen Einfluss auf die Virusvermehrung, das Zellwachstum oder die Zelldifferenzierung nehmen können. (Samuel, 1991)

Ein anderer Weg der Proteinsynthesehemmung wird durch die interferoninduzierte Proteinkinase DAI gegeben. Auch hier ist die doppelsträngige RNA der auslösende Aktivitätsfaktor. Der Translationselongationsfaktor eIF2 $\alpha$  wird durch die Phosphorylierung inaktiviert und die Fortsetzung der Aminosäurenkette wird unterbrochen.

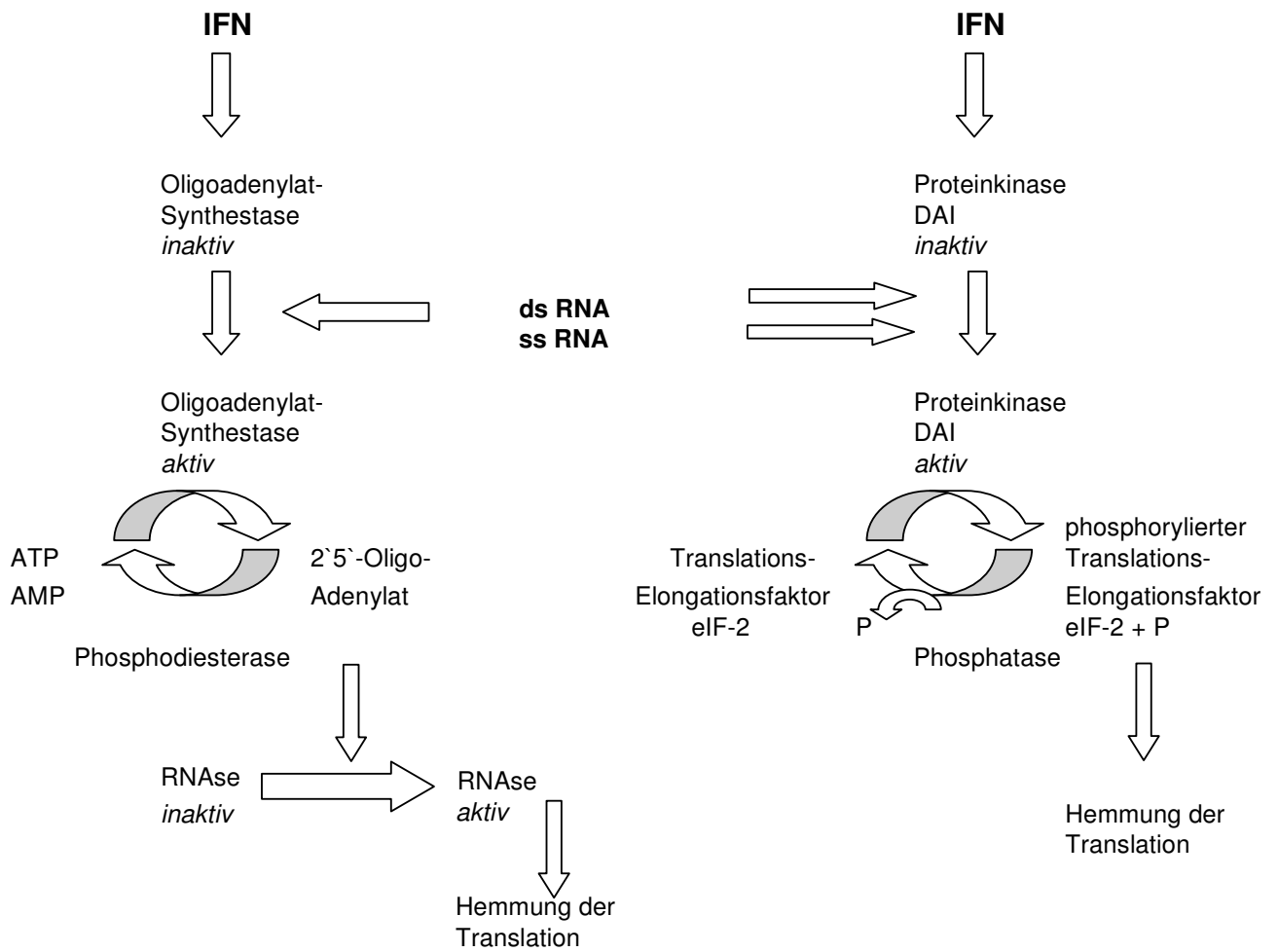


Abb. 30: Darstellung der Wirkung Interferon induzierter Proteine anhand der 2'5'-Oligoadenylatsynthetase und Proteinkinase DAI

## 7.2.2 Das Mx-Protein

### 7.2.2.1 Entdeckung des Mx-Proteins

Das interferoninduzierte Mx1-Protein wurde 1962 von Lindenmann entdeckt. Mit der Beobachtung, dass nur bestimmte Mäuse gegenüber dem Influenzavirus Resistenz aufweisen, konnte das dominant vererbte Mx1-Gen nachgewiesen werden. Bei Mäusen akkumuliert das Mx1-Protein im Zellkern und hemmt dort die mRNA Synthese der Influenzaviren. (Kayser, 1997) Jedoch wird die Replikation von normalerweise interferonsensitiven Viren, wie zum Beispiel das vesikuläre Stomatitis Virus durch das Mx1- Protein nicht beeinflusst. (Staeli, 1986)

Mit einer komplementären DNS-Klon Analyse wurde das Mx-Protein als 631 Aminosäuren langes bzw. 72 kDa großes Protein beschrieben. Am N-terminalen Ende befindet sich eine regulatorische Domäne, am C-terminalen Ende eine biologisch wirkende Domäne. (Kim, 1991) Die sich an dem N-terminalen Ende befindliche GTP-Bindungsstelle ist Untersuchungen nach für die antivirale Aktivität essentiell. (Pitossi, 1993; Ponten, 1997) Somit zählt man die Mx-Proteine zu den hochmolekularen GTPasen, die mit ihrer Lokalisation im Cytoplasma wichtige Aufgaben in der Endozytose und dem intrazellulären Transport übernehmen. (Rothman, 1990) Dadurch ist denkbar, dass Mx Proteine die Ein- oder Ausschleusung von Virionen oder auch die Anordnung neu synthetisierter Proteine beeinflussen können.

Als 1989 menschliche Zellen mit Interferon alpha oder beta behandelt wurden, konnte man zwei Proteine nachweisen, die eine große Homologie mit dem Mx1-Protein der Maus aufweisen. (Aebi, 1989; Horisberger, 1990) Die Gene dieser zwei Proteine MxA mit 664 Aminosäuren (76 kDa) und MxB mit 633 Aminosäuren (73 kDa) liegen auf dem Chromosom 21. (Gardiner, 1990) Wird ein MxA Protein in Mx-negativen murinen 3T3-Zellen expremiert, so sind diese Zellen den Influenza- wie auch den vesikulären Stomatitis Viren gegenüber resistent. Die Resistenz konnte jedoch nicht bei Viren, wie dem Picornavirus, dem Menigovirus, einem Togavirus oder Semliki Forest Virus nachgewiesen werden. Hierin unterscheidet sich das MxB Protein, das gegen alle vorher genannten Viren empfindlich ist. (Pavlovic, 1990)

### 7.2.2.2 Molekülstruktur des MxA Proteins

Das N-terminale Ende des Mx Proteins enthält drei GTP bindende Elemente: hochaktive GTPasen für Effektormoleküle, virale Ribonucleoprotein- Bruchstücke und einem GTP $\gamma$ S als stabilisierenden Faktor. (Kochs, 1998) Die GTP Bindung scheint für die antivirale Wirkung entscheidend. Veränderungen in der N-terminalen Region, gehen mit einer verminderten antiviralen Wirkung einher.

Das C-terminale Ende besteht aus basischen Aminosäuren, die von zwei Leucin haltigen Abschnitten unterbrochen werden. Diese bilden eine  $\alpha$  Helix mit amphipathischem Charakter, die für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich ist. Mutationen in diesem Bereich verändern die antivirale Aktivität. Der Austausch einer Aminosäure (E645) im zweiten Leucin Abschnitt eines humanen MxA Proteins bewirkt den Verlust der antiviralen Aktivität gegen das vesikuläre Stomatitis Virus. Die Wirkung gegen das Influenzavirus, wie Thogoto Virus bleibt erhalten. (Frese, 1995) Hieraus ergab sich die Vermutung, dass Domänen des C-terminalen Endes direkt mit viralen Strukturen interagieren.

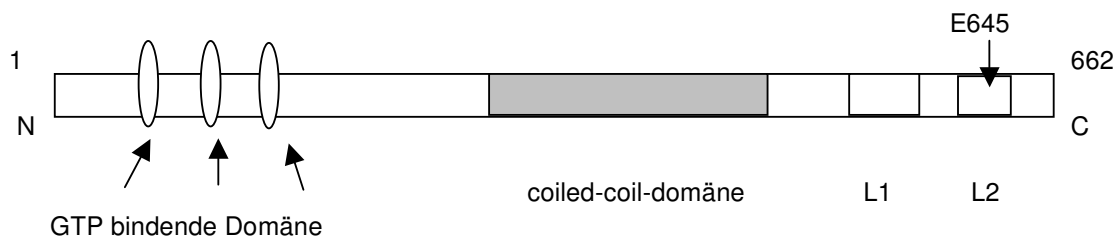


Abb. 31: Die funktionalen Domänen des MxA Proteins. Am N-terminalen Ende die drei hoch konservierten GTP bindenden Elemente. Das C-terminale Ende mit den beiden Leucin haltigen Abschnitten. Die coiled-coil Domäne ist vermutlich für intermolekulare Interaktionen verantwortlich. (modifiziert nach Kochs, 1998)

### 7.2.2.3 Modell der MxA Protein Wirkung

Der genaue Wirkmechanismus des Mx Protein auf Viren ist nicht vollständig geklärt.

Ein möglicher Ansatz wäre die MxA Proteinbindung an virale Ribonukleoproteinkomplexe nach der viralen Zellpenetration. Der Transport in den Nukleolus wird verhindert.

Kommt es zu einem gemeinsamen Eindringen in den Zellkern, könnte das MxA Protein die virale Transkription und Replikation beeinflussen. (Züricher, 1992)

Neu synthetisierte virale Proteine können durch die MxA Proteinbindung ein erneutes Eindringen in den Zellkern und damit die Genomamplifikation und sekundäre Transkription verhindern. (Frese, 1995; Kochs, 1998)

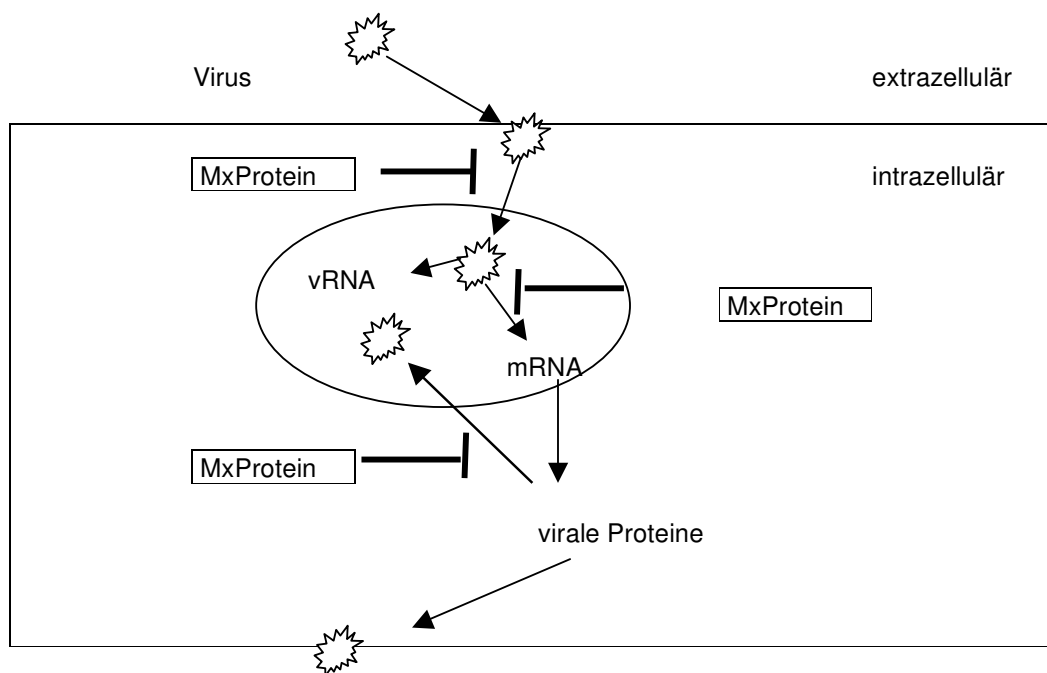


Abb. 32: Mögliche Wirkmechanismen des Mx Proteins gegen Mx Protein sensible Viren

### *7.3 Immunmodulatorische Wirkung*

Interferone spielen in der unspezifischen Abwehr eine wichtige Rolle.

Sie erhöhen die Anzahl der Membranantigene, wie zum Beispiel das  $\beta$ 2-Mikroglobulin, das MHC Klasse I Molekül oder den IgG-Fc Rezeptor. (Hokland, 1981). Sie aktivieren die natürlichen Killerzellen, Makrophagen und bestimmte T-Zellen und wirken auf Zellen der lymphoiden Reihe indem sie ihre Differenzierung begünstigen und ihre Zytotoxizität und die Ausbildung von Zytokinen verstärken. (Herberman, 1997)

Ein immunmodulatorisch wichtiges Zellprotein, das durch die Interferonwirkung entsteht ist das MHC-Klasse I Antigen. So können virale Fragmente vermehrt auf der Zelloberfläche präsentiert werden und die infizierten Zellen sind durch die zytotoxischen T-Zellen angreifbar. (Modrow, 1998 c)

Während die Stimulation der MHC Klasse I Antigen Expression durch beide Interferon Typen erreicht wird, kann die MHC Klasse II Antigen Expression nur durch Typ II Interferon beeinflusst werden.

Durch Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) oder andere Zelloberflächen-Markermoleküle reguliert Interferon ebenso die Immunantwort. (Meager, 1996; Levy, 1998)

## 8. Eigene Ergebnisse

### 8.1. Dosiswirkungskurve mit rInterferon alpha 2b

Von rInterferon alpha 2b wurde eine Dosiswirkungskurve erstellt, um den richtigen Konzentrationsbereich festzulegen. Dieser Subtyp wurde deshalb hergenommen, da er in der klinischen Therapie verwendet wird und man einen Vergleich der Dosierungen heranziehen kann. Hierbei wird mit 100 Units pro ml, das 0,3 ng pro ml entspricht, eine Hemmung von 30% erreicht, was den Beginn des Plateauwertes der Hemmkurve darstellt.

In den folgenden Versuchen wird daher mit den Interferonen in einem Konzentrationsbereich um 0,3 ng pro ml gearbeitet.

Das rekombinant hergestellte Interferon alpha 2b findet in der Therapie von verschiedenen Malignomen und chronischen Hepatitiden seine Anwendung.

Zur Identifizierung und Bestimmung der Aktivität und des Reinheitsgrades des in *Escherichia coli* erzeugten Interferons werden verschiedenen Assays angewandt.

Die zu messende antivirale Aktivität eines rInterferon alpha ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig.

### 8.2. Zytotoxizitätstest

Da die Interferone an sich einen zytotoxischen, sowie einen antiproliferativen Effekt an den transfizierten Karzinomzellen hervorrufen können, wurde ein Zytotoxizitätstest und die Bestimmung des Proteingehaltes durchgeführt.

Die Annahme einer antiproliferativen Wirkung aufgrund der Zytotoxizität der Interferone kann in der Konzentration, die in den Versuchen angewandt wurde, aufgrund der Ergebnisse des Testes verworfen werden.

### 8.3. Dosiswirkungskurve mit rInterferon alpha 1 und 8

Von den Interferonen alpha 1 und 8 wurde ebenfalls eine Dosiswirkungskurve erstellt.

Es wurden diese Interferone ausgewählt, da das Interferon alpha 1 das am schwächsten hemmende Interferon unter den alpha Subtypen darstellt, wohingegen das Interferon alpha 8 das Potenteste ist.

Es wurde in allen Versuchen ein gleichbleibender Proteingehalt der gesamten Proben nachgewiesen. Durch die Darstellung der spezifischen Hemmung wurde die selektive virale Proliferationshemmung verifiziert.

Interferon alpha 1 erreicht mit Konzentrationen bis zu 20 ng/ml eine Hemmung von 42% . Mit Interferon alpha 8 werden schon bei Konzentrationen von maximal 5 ng/ml Hemmungen von 62% erlangt.

Die Molekulargewichte beider Interferone liegen in dem Bereich von 19. Doch trotz der abweichenden Konzentrationen, in denen sie in den Versuchen angewendet wurden, zeigen sie einen signifikanten Unterschied in ihrer virushemmenden Eigenschaft.

Daraus lässt sich schon eine Vermutung erheben, dass es unterschiedliche Wirkweisen der Interferonsubtypen geben muss.

In einer Arbeit von Sidney Pestka werden die unterschiedlichen Aktivitätsprofile der Subtypen beschrieben. (Pestka, 1997b) Bei einer Aktivitätsbestimmung gereinigter Interferone in humanen und bovinen Zellen ergaben sich unterschiedliche antivirale Aktivitäten der gleichen Interferone. Es wurden Unterschiede bis zum 1000-fachen gefunden. Auch zwischen antiviraler, antiproliferativer Aktivität und natürlicher Killerzellen Stimulation ergaben sich keine eindeutigen Korrelationen.

In einem Vergleich der Relation antiviraler zu antiproliferativer Aktivität und antiviraler Aktivität zur Stimulation natürlicher Killerzellen sind in dem Beispiel von Interferon alpha 2a (= IFN  $\alpha$  A) und alpha 1 (= IFN  $\alpha$  D) die Schwerpunkte ihrer Aktivität klar zu erkennen.

Man kann diese Eigenschaften der einzelnen Interferone jedoch völlig ändern, in dem man synthetisch eine Mischung z.B. dieser zwei Interferone vornimmt. Dieses Mischinterferon Interferon alpha 1/2a (= IFN  $\alpha$  A/D) vertritt nun ganz neue Eigenschaften, die weder mit den Eigenschaften des Interferon alpha 1 noch des alpha 2a übereinstimmen.

Folglich muss es für jedes Interferon alpha ein eigenes Wirkungsprofil geben.



Verhältnis der spezifischen Molekularen Aktivitäten		
IFN- $\alpha$	AV/AP	AV/NK
2a	0.38	41.0
1	0.80	1.3
2a/1 ( <i>Bgl</i> )	0.59	95.0
2a/1 ( <i>Pvu</i> )	0.14	3.2
1/2a ( <i>Bgl</i> )	1.7	6.0
1/2a ( <i>Pvu</i> )	0.14	13.0
2a/1/2a	0.60	1.8
Abkürzungen: AV= antivirale Aktivität; AP= antiproliferative Aktivität; NK= durch natürliche Killerzellen stimulierte Aktivität		

Abb. 33: Vergleich antiviraler zu antiproliferativer Aktivität und antiviraler Aktivität zur Stimulation natürlicher Killerzellen durch Interferon A bzw. D und ihren synthetisch hergestellten Mischformen (modifizierte Tabelle nach Pestka, 1997b)

Auch in einem Vergleich von 8 verschiedenen Interferon alpha Subtypen, eines Interferon  $\beta$ 1a und eines Interferon gamma miteinander ergaben sich signifikante Unterschiede in der Hemmung des HBV- Luciferase Plasmides. In den drei verschiedenen Interferonkonzentrationen 0,1 ; 0,5 und 2,0 ng/ml erwies sich stets Interferon alpha 1 als der am schwächsten wirksamste, Interferon alpha 8 als der am stärksten hemmendste Subtyp. Interferon  $\beta$ 1a lag in seiner hemmenden Aktivität noch über dem Interferon alpha 8. Die Interferone alpha 2b, 5, 10, 14, 17, 21 und das Typ II Interferon gamma zeigten keine Extreme.

Interferon alpha 2b, das derzeit weltweit in der Therapie verwendet wird, ist in seiner unspezifischen Hemmung das zweit potenteste Interferon alpha. Bezieht man die Hemmung der Luciferaseaktivität auf den Proteingehalt der Probe, so liegt das Interferon alpha 2b in seiner Aktivität im unteren Wirkungsbereich.

Erstaunlicherweise nimmt das Interferon alpha 8 in der spezifischen Hemmung den Platz des am stärksten hemmenden Interferons unter allen Interferonen ein und das Interferon  $\beta$ 1a kann seine

starke Aktivität nur in hoher Dosierung erreichen. Das Interferon alpha 8 wird bei der spezifischen Hemmung von dem Interferon alpha 21 unterboten.

#### *8.4. Aktivitätsverhalten der Typ I Interferone in äquimolarer Dosis*

Um einen Eindruck zu bekommen, ob das Molekülverhältnis der Interferone untereinander sich in der Aktivität der Interferonen auswirkt, ist ein Versuch in äquimolarer Interferonkonzentration durchgeführt worden. Als Ausgangswert ist das Interferon alpha 2b zur Umrechnung genommen worden. Getestet wurden das Interferon alpha 8, als potentester alpha Subtyp, das Interferon  $\beta$ 1a als potentestes Typ I Interferon, das Interferon gamma als Typ II Interferon, das sich in den vorherigen Versuchen als schwach wirksames Interferon darstellte, und das Consensusinterferon. Doch auch hier verhalten sich die Interferone in ihrer Aktivitätsprofil wie in den Versuchen in gleicher ng/ml Konzentration. Das Consensusinterferon stellt sich als ein sehr gut auf die Luciferaseaktivität inhibitorisch wirkendes Interferon dar und wird nur durch das Interferon  $\beta$ 1a übertroffen.

Somit wurde gezeigt, dass das Molekulargewicht der Interferone ihre antivirale Aktivität nicht beeinflusst.

#### *8.5. Das Consensus Interferon*

In der Literatur wird in mehreren Artikeln die hohe antivirale Aktivität des Consensusinterferons beschrieben. Die biologische Aktivität des Consensusinterferons gegenüber anderen Interferon alpha Subtypen war in mit DNA oder RNA transfizierten HeLa, WISH oder Hep -2 Zellen 5- bis 20- fach höher. (Hu, 1995; Ozes, 1992)

Consensusinterferon steigert die Aktivität natürlicher Killerzellen (Alton, 1983) und erhöht die Produktion von Zytokinen. (Tilg, 1993) Ein möglicher Unterschied in der Aktivitätsdifferenz liegt in der Beobachtung, dass hypervariable Aminosäuresequenzen an einer sekundären Bindung beteiligt sind. Durch ihre Bindung an die Bindungsstellen können die hinzugekommenen Proteine die interferonspezifische Wirkung beeinflussen. Da das Consensusinterferon einen Durchschnitt an allen hypervariablen Aminosäuresequenzen aufweist, ist die Bindungsaffinität größer, was

durch eine vermehrte Anzahl der Bindungsstellen begründete sein könnte. (Korn, 1994; Blatt, 1996)

#### *8.6. Vergleich der Rezeptoraffinität und der Aktivität in der Literatur*

Die Rezeptoraffinität unter den Typ I Interferonen zeigt unterschiedliche Stärken. (Pfeffer, 1998) Sowohl natürliche, sowie synthetische Interferon alpha Subtypen wurden unter Beibehaltung ihrer biologischen Aktivität mit Jod 125 gekennzeichnet. Der Versuch wurde mit verschiedenen Konzentrationen an unmarkiertem Interferon alpha gegen ein jodiertes Interferon und an unterschiedlichen Zellen durchgeführt. In der Daudi lymphoblastoid Zellreihe zeigten Interferon con 1 und alpha 2b die höchste Affinität, knapp gefolgt von Interferon alpha 8. Interferon alpha 7 wies nur eine sehr schwache Rezeptorbindung auf.

Auch in der Verwendung von renalen Karzinomzellen ergaben sich die gleichen Affinitätsverhältnisse.

Die hohen Hemmwerte von Consensusinterferon, Interferon alpha 2b und 8 an dem HBV Luciferase Plasmid in den Leberkarzinomzellen könnten somit durch ihre hohe Rezeptoraffinität begründet werden.

#### *8.7. Aktivitätsverhalten der Typ I Interferone bei gleicher Gabe von I.E.*

Unter Berücksichtigung des klinischen Aspektes wurden in einem Versuch die Interferone in der gleichen Konzentration in I.E. gegeneinander verglichen. Interferon alpha 8 wurde als potentestes Interferon alpha als Richtwert genommen.

Interferon alpha 8 verlor im Vergleich seine Stellung als potentestes Interferon alpha. Die Aktivität von Interferon alpha 2b nahm zu.

Die Frage, warum die Interferone in gleicher Konzentration der I.E. ein anderes Wirkmaximum haben wie in gleicher ng/ml Konzentration kann wie folgt beantwortet werden.

Bei den kommerziell erhältlichen Interferonen ist die Aktivität mit einem antiviralen Assay bestimmt, in dem vesikuläre Stomatitis Virus infizierte MDBK Kalbszellen verwendet wurden.

Die Interferone wurden nun in einer Menge mit einer bestimmten Aktivität (275 I.E./ml),

gemessen in MDBK Kalbszellen, zu humanen Hepatomzellen gegeben. Hier tritt nun wieder der Effekt in Kraft, dass die Interferone unterschiedliche Ausprägungen ihrer antiviralen Aktivitäten in verschiedenen Zellen aufweisen. Durch die unterschiedlichen Aktivitäten erklären sich auch abweichenden Hemmwirkungen zwischen I.E. und ng pro ml.

## V. Zusammenfassung

Interferone spielen durch ihre immunmodulatorische Wirkung sowie durch die direkte antivirale und antiproliferative Aktivität eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen.

Im Gegensatz zum Typ II Interferon Gamma bestehen die Typ I Interferone aus einer Gruppe strukturell ähnlich aufgebauter Zytokine, die sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden. Insgesamt über 20 Gene auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 kodieren für 13 verschiedene Interferon alpha Subtypen und je einem Interferon beta und Interferon omega. Die Bedeutung der Co-Existenz der Interferon alpha Subtypen konnte bisher noch nicht hinreichend wissenschaftlich geklärt werden. Eine genaue Untersuchung der antiviralen Potenz und somit biologischen Wirkunterschiede der Interferon Subtypen ist insbesondere hinsichtlich der bereits klinisch angewandten Therapie der chronischen Hepatitis B mit Interferon alpha 2 von grossem Interesse. In der vorliegenden Arbeit werden die Unterschiede der Interferon alpha Subtypen und des Interferon betas bezüglich ihrer biologischen Aktivität anhand eines *in vitro* Modells untersucht. In sämtlichen Untersuchungen werden Hepatomzellen mit einem Reporterplasmid mit Luciferaseaktivität transfiziert, in das die genregulatorischen HBV-Sequenzen Enhancer I, II und core promoter eingesetzt wurden. Diese HBV-Sequenzen steuern die Transkription des Nukleokapsid, das für die HBV-Replikation essentiell ist. Die Wirkung rekombinant hergestellter Typ I Interferone wird durch eine verminderte virale Genexpression HBV transfizierter Hepatomzellen dargestellt.

Die Hemmung der Virusreplikation kann durch die Typ I Interferone in verschiedenen Stadien erfolgen. Mögliche Angriffspunkte sind die Transkription und Translation sowie die Virusreifung und die Freisetzung der Virionen. Durch die Verwendung des Reportergen Assays wird in dieser Arbeit die Hemmung auf Transkriptionsebene dargestellt. Die immunmodulatorische Wirkung der Interferone wurde in diesen Versuchen nicht berücksichtigt.

Bei allen untersuchten Typ I Interferonen konnte ein inhibitorischer Effekt auf die HBV regulierte Transkription nachgewiesen werden. Es konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der biologischen Aktivität der Interferon alpha Subtypen gezeigt werden. In allen untersuchten Interferonkonzentrationen, die nicht im zytotoxischen Bereich liegen, zeigte sich Interferon alpha 1 als das Schwächste und Interferon alpha 8 als das Potenteste der alpha Subtypen. Interferon alpha 5, welches in der humanen Leber die höchste Konzentration aufweist, erreichte als Monosubstanz nur eine im Vergleich zu anderen Subtypen durchschnittliche antivirale Aktivität.

In der Kombination mit den potentesten Interferon alpha Subtypen 2b, 8 und 17 und  $\beta$  Interferon zeigte sich weder ein synergistischer noch antagonistischer Effekt.

Das synthetisch hergestellte Consensusinterferon, welches in der antiviralen Wirkung nur von Interferon beta übertroffen wird, wies die höchste biologische Aktivität aller alpha Interferone im verwendeten Zellkultursystem auf.

Die unterschiedlichen Wirkungen der Interferon Subtypen sind durch ein Zusammenspiel verschiedenster Faktoren zu sehen. Der antiproliferative Effekt der Interferone wird zunächst durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren an den Zielzellen vermittelt. Die Informationsweiterleitung erfolgt durch Aktivierung von zytoplasmatischen Signaltransduktionswegen und somit kann Einfluss auf die Regulation der Genexpression im Zellkern genommen werden. Da für alle Typ I Interferone bisher nur ein einziger Rezeptortyp beschrieben wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die Interferon alpha Subtypen über den gleichen Rezeptor die Expression unterschiedlicher Gene induzieren können.

Auch die Sensitivität der Zellen auf die interferoninduzierte antivirale Aktivität ist vom Zelltyp sowie vom verwendeten Virus abhängig. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Bedeutung der unterschiedlichen Interferonwirkungen, sowie ihre Zelltyp spezifische Produktion und die unterschiedliche Sensitivität einzelner Interferone aufzuzeigen.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutliche Wirkunterschiede hinsichtlich der antiviralen Potenz in der Gruppe der Typ I Interferone. Insbesondere im Vergleich zum bereits therapeutisch verwendeten Interferon alpha 2b wies Interferon alpha 8, sowie Consensusinterferon und Interferon beta eine deutlich höhere antivirale Aktivität auf. In wie weit sich diese Ergebnisse durch klinische Studien bestätigt werden können, muss abgewartet werden.

## VI. Literaturverzeichnis

Aebi, M., Fah, J., Hurt, N., Samuel, C.E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovi, J., Haller, O., Staeheli, P.

cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins  
Mol Cell Biol 9, 1989, 5062-5072

Alton, K., Stabinsky, Y., Richards, R., Ferguson, B., Goldstein, L., Altmann, B., Miller, L., Stebbing, N.

Production, characterization and biological effects of recombinant DNA  
Derived human IFN-alpha and IFN-gamma analogs.

In "The Biology of the Interferon System",

De Macoyer, E., Schellekens, H. (Eds.), Amsterdam:Elsevier, 1983, 119-128

Benoit, P., Maguire, D., Plavec, I., Kocher, H., Tovey, M., Meyer, F.

A monoclonal antibody to recombinant human Interferon alpha receptor inhibits biologic  
activity of several species of human Interferon alpha, Interferon beta, and Interferon omega :

Detection of heterogeneity of the cellular type I Interferon receptor

J Immunol 150, 1993, 707-716

Blatt, L.M., Davis, J.M., Klein, S.B., Taylor, M.W.

The Biologic Activity and Molecular Characterisation of a Novel Synthetic Interferon –Alpha  
Species, Consensus Interferon

J Interferon Cytocine Res 16, 1996, 489-499

Bordens, R., Grossberg, S.E., Trotta, P.P., Nagabhushan, T.L.

Molecular and biologic characterization of recombinant interferon alpha 2b

Semin Oncol 24(suppl9), 1997, S9-41 -S9-51

Brack, C., Nagata, S., Mantei, N., Weissmann, C.

Molecular analysis of the human interferon- alpha gene family

Gene 15, 1981, 379-394

Branca, A.A., Baglioni, C.

Evidence that types I and II interferons have different receptors

Nature 284, 1980, 459-461

Bryan, R.G., Haque, W., Haque, S. J.

Interacting Pathways of Interferon Signaling

Semin Oncol 24(suppl9), 1997, S9-70 - S9-77

Chebath, J., Bebech, P., Hovanessian, A.G., Galabru, J., Revel, M.

Four different forms of interferon- induced 2',5'- oligo(A) synthetase identified by  
immunoblotting in human cells

J Biol Chem 262, 1987, 3852-3857

Coccia, E.M., Romeo, G., Nissim, A., Marziali, G., Alberini, R., Affabris, E., Battistini, A., Fiorucci, G., Orsetti, R., Rossi, G.B., Chebath, J.

A full-length murine 2-5A synthetase cDNA transfected in NIH-3T3 cells impairs EMCV but not VSV replication

Virology 179, 1990, 228-233

Colamonici, O. R., Domanski, P.

Identification of a novel subunit of the type I interferon receptor localized to human chromosome 21

J Biol Chem 268, 1993, 10895-10899

Colamonici, O. R., Pfeffer, L. M., D'Alessandro, F., Plataniias, L.C., Gregory, S.A., Rosden, A., Nordan, R., Cruciali, R.A., Diaz, M.O.

Multichain structure of the interferon alpha receptor on hematopoietic cells

J Immunol 148, 1992, 2126-2132

Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C.

Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes

Genomics 29, 1995, 225-228

Darnell, J.E. Jr, Kerr, I.M., Stark, G.R.

Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins

Science 264, 1994, 1415-1421

Decartis, M., Sabthanam, S., O'Byrne, K.

Potential of Interferon alpha in Solid Tumours: Part 1

Bio Drugs 16, 2002, 261-281

Dent, C. L., Gewert, D.R.

A regulatory domain within the virus-response element of the interferon alpha 1 gene acts as a transcriptional repressor sequence and determinant of cell-specific gene expression

Eur J Biochem 236, 1996, 895-903

Dianzani, F., Salter, L., Fleischmann, W.R. Jr., Zucca, M.

Immune interferon activates cells more slowly than does virus-induced interferon

Infect Immun 20, 1978, 55-57

Domanski, P., Witte, M., Kellum, M.

Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha/beta receptor that is required for signaling

J Biol Chem 270, 1995, 21606-21611

Du, W., Thanos, D., Maniatis, T

Mechanism of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements

Cell 74, 1993, 887-898



- Eger, G., Kalden, J.  
 Immunologie internistischer Erkrankungen, Komponenten des unspezifischen Immunsystems  
 In „Innere Medizin“, Schettler, G., Greten, H. (Hrsg.)  
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 1998, 9. Auflage, 1179-1180
- Epstein, C. J., McManus, N. H., Epstein, L. B.  
 Direct evidence that the gene product of the human chromosome 21 locus, IFRC, is the  
 interferon alpha receptor  
 Biochem Biophys Res Commun 107, 1982, 1060-1066
- Familletti, P.C., McCandliss, R., Pestka, S.  
 Production of high levels of human leukocyte interferon from a continuous human myeloblast  
 cell culture  
 Antimicrob Agents Chemother 20, 1981, 5-9
- Fasler-Kann, E., Pansky, A., Wiederkehr, M., Battegnny, M., Heim, M.H.  
 Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi  
 cells.  
 J. Biochem 254, 1998, 514-519
- Finter, N.B.  
 Is there Life without Interferon?  
 In "Interferon: The Dawn of recombinant Protein Drugs",  
 Lindenmann, J., Schleuning, W.D. (Eds.),  
 Ernst Schering Research Foundation Workshop Supplement 5  
 Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1999, 1-14
- Frese, M., Kochs, G., Maier-Dieter, U., Siebler, J., and Haller, O.  
 J Virol 69, 1995, 3904-3909
- Friesen, H.J., Stein, S., Evinger, M., Familletti, P.C., Moschera, J., Meienhofer, J., Shively, J.,  
 Pestka, S.  
 Purification and molecular characterization of human fibroblast interferon  
 Arch Biochem Biophys 206, 1981, 432-450
- Fu, X.-Y., Schindler, C., Improta, T.  
 The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene  
 family involved in signal transduction  
 Proc Natl Acad Sci USA 89, 1992, 7840-7843
- Fujita, T., Sakakibara, J., Sudo, Y., Miyamoto, M., Kimura, Y., Taniguchi, T.  
 Evidence for an nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to  
 human IFN- beta gene regulatory elements  
 EMBO J 7, 1988, 3397-3405

von Gabain, A., Ohlsson, A., Holmgren, M., Josephsson, E.,  
Alkan, S., Lundgren, E.  
Differential structures and activities of three IFN-alpha 2 variants departing  
at only two amino acid positions  
In "Biology of the Interferon System",  
Cantell, K., Schellekens, H. (Eds.) Dordrecht:Martinus Nijhoff Pubs., pp  
1987, 11-18

Ganes, C.S., Lengyel, P.  
Minireview, The Interferon System  
J Biol Chem 267, Nr. 8, 1992, 5017-5020

Gardiner, K., Horisberger, M.A., Kraus, J., Tantravahi, U., Korenber, J., Rao, V.,  
Reddy, S., Patterson, D.  
Analysis of human Chromosom 21: Correlation of physical and cytogenetic maps-gene and  
CpG island distributions  
EMBO J 9, 1990, 25-34

Goodbourn, S., Zinn, K., Maniatis, T.  
Human beta Interferon gen expression is regulated by an inducible enhancer element  
Cell 41, 1985, 509-520

Hardie, G. Hanks, S.  
The Protein Kinase Facts book, Protein-Tyrosin Kinases :  
Wilks,A.  
Janus kinases 1 and 2 (vertebrates) (Just another kinases 1 and 2)  
Academic 1995 a, 117-119

Hardie, G. Hanks, S.  
The Protein Kinase Facts book, Protein-Tyrosin Kinases :  
Krolewski, J.J.  
Interferon alpha regulated PTK (vertebrates) (p135 Tyk2)  
Academic 1995 b, 114-116

Herberman, R.B.  
Effect of alpha-Interferons on Immune Function  
Semin Oncol 24(supp19), 1997, S9-78 - S9-80

Hiscott, J., Cantell, K., Weissmann, C.  
Differential expression of human interferon genes  
Nucleic Acids Res 12, 1984, 3727-2746

Hobbs, D.S., Pestka, S.  
Purification and characerization of interferons from a continuous myeloblastic cell line  
J Biol Chem 257, 1982, 4071-6

- Hoey, T., Schindler, U.  
STAT strukture and function in signaling  
Curr opin Gen Dev 8, 1998, 582-587
- Hokland, M., Berg, K.  
Interferon enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human polymorphonuclear leukocytes  
J Immunol 127, 1981, 1585
- Hopf, U., Niederau, C., Kleber, G., Fleig, W.E.  
Behandlung der chronischen Virushepatitis B/D und der akuten und chronischen Virushepatitis C  
Konsensus der Deuteschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten  
Z Gastroenterol 35, 1997, 971-986
- Horisberger, M. A., McMaster, G.K., Zeller, H., Wathelet, M.G., Dellis, J., Content, J.  
Cloning and sequence analyses of cDNAs for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: Functional study of the corresponding gene promoter  
J Virol 64, 1990, 1171-1181
- Hu, C.J., Ozes, O.N., Klein, S.B., Blatt, L.M., Taylor, M.W.  
A comparison of the in vitro host range of recombinant met-interferon-Con 1, interferon-alpha 2a, and Interferon beta  
J Interferon Cytokine Res 15, 1995, 231-234
- Ihle, J.N.  
Cytokine receptor signalling  
Nature 377, 1995, 591-594
- Isaacs, A., Lindenmann, J.  
Virus interference.1. The interferon.  
Proc Roy Soc London Ser B 147, 1957, 258-273
- Ito, Y., Bando, H., Komodo, H., Tsurudome, M., Nishio, M., Kawanko, M.  
HN proteins of human parainfluenza typ 4A virus expressed in cell lines transfected with a cloned cDNA have an ability to induce interferon in mouse spleen cells  
J Gen Virol 75, 1994, 567-572
- Jacobsen, H.  
Interferons and antiviral activity  
Arzneim Forch Drug Res 36,1986, 512-516
- Kaiser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M.  
Abwehrmechanismen, Allgemeine Virologie  
In „Medizinische Mikrobiologie“, Bienz, K.A. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1998, 9. überarbeitete und neugestaltete Auflage, 404-406

- Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., Jay, G.  
 HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice  
 Nature 351, 1991, 317-320
- Kochs, G., Trost, M., Janzen, C., Haller, O.  
 MxA GTPase: oligomerization and GTP-Dependent Interaction with Viral Target Structures  
 Methods: A companion to Methods in Enzymology, 15, 1998, 255-263
- Kontsek, P.  
 Human type I interferons: structure and function  
 Acta Virol 38, 1994, 345-360
- Korn, A.P., Rose, D.R., Fish, E.N.  
 Three-dimensional model of a human interferon-alpha consensus sequence  
 J Interferon Res 14, 1994, 1-9
- Läer, S.  
 Rekombinante Interferone- Pharmakokinetik und Implikation für die Therapie  
 Dtsch. med. Wschr., 123  
 Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York 1998, 1320-1327
- Langer, J. A., Rashidbaigi, A., Lai, L.W., Paterson, D., Jones, C.  
 Sublocalization on chromosome 21 of human interferon alpha receptor gene and the gene for  
 an interferon gamma response protein  
 Somat Cell Mol Genet 16, 1990, 231-240
- Leblanc, J.-F., Cohen, L., Rodrigues, M., Hiscott, J.  
 Synergism between distinct enhancer domains in viral induction of the human beta interferon  
 gene  
 Mol Cell Biol 10, 1990, 3987-3993
- Leonardo, M. J., Fan, C. M., Maniatis, T., Baltimore, D.  
 The involvement of NF-kappaB in beta- interferon gene regulation reveals its role as widely  
 inducible mediator of signal transduction  
 Cell 57, 1989, 287-294
- Leung, N.  
 Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy  
 Gastroenterol Hepatol 17 (4), 2002, 409-414
- Leung, S., Qureshi, S.A., Kerr, I.M.  
 Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway  
 Mol Cell Biol 15, 1995, 1312-1317
- Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R.  
 Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive  
 and negative transcriptional control  
 Gene Dev 2, 1988, 383-393

Levy, S., Todd, S.C., Maecker, H.T.  
CD81 TAPA-1: a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system  
Annu Rev Immunol 16, 1998, 89

Liaw, Y.F.  
Management of patients with chronic hepatitis B  
Gastroenterol Hepatol 17 (4), 2002, 406-408

Lutfalla, G., Roeckel, N., Mogensen, K. E., Mattei, M.G., Uze, G.  
Assignment of the human interferon alpha receptor gene to chromosome 21q22.1 by in situ hybridization  
J Interferon Cytokine Res 10, 1990, 515-517

Lutfalla, G., Holland, S.J., Cinato, E.  
Mutant U5A cells are complemented by an interferon alpha/beta receptor subunit generated by alternativ processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster  
EMBO J 14, 1995, 5100-5108

Lydon, N.B., Favre, C., Bove, S., Neyret, O., Benureau, S.,  
Levine, A.M., Seelig, G.F., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P.  
Immunochemical mapping of alpha-2-interferon  
Biochemistry 24, 1985, 4131-4141

Marie, I., Svab, J., Robert, N., Galabru, J., Hovanessian, A.G.  
Differential expression and distinct structure of 69- and 100- kDa forms of 2-5A synthetase in human cells treated with interferon  
J Biol Chem, 265, 1990, 18601-18607

Meager, A.  
Bioimmunoassays for proinflammatory cytokines involving cytokine- induced cellular adhesion molecule expression in human glioblastoma cell lines  
J. Immunol. Methods 190, 1996, 235

Modrow, S., Falke, D.  
Interferone, Molekulare Eigenschaften.  
In „Molekulare Virologie“, Modrow, S., Falke, D. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998 a, 1. korrigierter Nachdruck, 66-67

Modrow, S., Falke, D.  
Das humane Hepatitis-B-Virus, Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom  
In „Molekulare Virologie“, Modrow, S., Falke, D. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998 b, 1. korrigierter Nachdruck, 347-354

Modrow, S., Falke, D.  
Interferone, Wirkungsweise.  
In „Molekulare Virologie“, Modrow, S., Falke, D. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 1998 c, 1. korrigierter Nachdruck, 67-68

- Nyman, A., Tölö, H., Parkkinen, J., Kalkkinen, N.  
 Identification of nine interferon- $\alpha$  subtypes produced by Sendai virus-  
 Induced human peripheral blood leucocytes  
 Biochem J 329, 1998, 295-302
- Ozes, O.N., Reiter, Z., Kelin, S., Blatt, L.M., Taylor, M.W.  
 A comparison of interferon-Con1 with natural recombinant interferon-alpha:antiviral,  
 antiproliferative and natural killer inducing activities  
 J Interferon Cytokine Res 12, 1992, 55-59
- Pavlovic, J., Zurcher, T., Haller, O., Staeheli, P.  
 Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of  
 human MxA protein  
 J Virol 64, 1990, 3370-3375
- Pestka, S., Trotta, P.P.  
 Recombinant Alfa-Interferons from naturally occurring genes, Introduction,  
 Semin Oncol 24(suppl9), 1997 a, S9-1 - S9-3
- Pestka, S.  
 The human Interferon- $\alpha$  Spezies and Hybrid Proteins,  
 Semin Oncol 24(suppl9), 1997 b, S9-4 -S9-17
- Pestka, S.  
 The interferon receptors  
 Semin Oncol 24(suppl9),1997 c, S9-18- S9-19
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E.  
 Interferons and their actions  
 Annu Rev Biochem 56, 1987, 727-777
- Pfeffer, L.M., Dinarello,C.A., Heberman, R.B., Williams, B.R.G., Borden, E.C.,  
 Bordens, R.,Walter, M.R., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P., Pestka, S.  
 Biological properties of recombinant alpha interferons: 40th anniversary of the discovery  
 of interferons  
 Cancer Res 58, 1998, 2489-2499
- Pitossi, F., Blank, A., Schröder, A., Schwars, A., Hussi, P., Schwemmle, M.,  
 Pavlovic, J., Staeheli, P.  
 A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins  
 J Virol 67, 1993, 6726-6732
- Ponten, A., Sick, C., Weber, M., Haller, O., Kochs, G.  
 Dominant-negative mutants of human MxA protein : domains in the carboxy-terminal moiety  
 are important for oligomerisation and antiviral activity  
 J Virol 71, 1997, 2591-2599

Radhakrishnan, R., Walter, L.J., Hruza, A., Reichert, P., Trotta, P.P., Nagabhushan, T.L., Walter, M.R.

Zinc mediated dimer of human interferon alpha 2b revealed by X-ray crystallography  
Structure 4, 1996, 1453-1463

Rani, M.R.S., Foster, G.R., Leung, S.

Characterization of BRI, one gene that is selectively induced by interferon beta compared with interferon alpha

J Biol Chem 271, 1996, 22878-22884

Reis, L. F. L., Harada, H., Wolchok, J. D., Taniguchi, T., Vilcek, J.

Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN- beta and IFN. Inducible genes

EMBO J 11, 1992, 185-193

Rogge, L., D'Ambrosio, D., Biffi, M., Penna, G., Minetti, L.J., Presky, D.H., Adorini, L., Sinigaglia, F.

The role of Stat 4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs

J Immunol 161, 1998, 6567-6574

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

A putative GTP binding protein homologous to vertebrate interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast vacuolar protein sorting

Cell 61, 1990, 1063-1074

Rubinstein, M., Rubinstein, S., Familletti, P.C., Miller, R.S., Waldman, A.A., Pestka, S.

Human leukocyte interferon : Production, purification to homogeneity and initial characterization

Proc Natl Acad Sci USA 76, 1979 (a), 640-644

Rubinstein, M., Rubinstein, S., Familletti, P.C., Miller, R.S., Waldman, A.A., Pestka, S.

Human leukocyte interferon production and purification to homogeneity by HPLC, in Peptides: Structure and biological function,

Gross, E., Meienhofer, J., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1979 (b), 99-103

Ryals, J., Dierks, P., Ragg, H., Weissmann, C.

A 46-nucleotide promoter segment from an IFN alpha gene renders an unrelated promoter inducible by virus

Cell 41, 1985, 497-507

Samuel, C.E.

Mechanisms of the antiviral action of interferons

Proc Nucl Acid Res 35, 1988, 27-72

Samuel, C.E.

Progress toward the understanding of the molecular mechanism of interferon action

Prog Clin Biol Res 246, 1987, 209-20

- Samuel, C.E.  
Antiviral Actions of Interferon ; Interferon-Regulated Cellular Proteins and Their Surprisingly Selective Antiviral Activities  
Virology 183, 1991, 1-11
- Schindler, C., Darnell, J.E. Jr  
Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway  
Annu Rev Biochem 64, 1995, 621-651
- Shows, T.B., Sakaguchi, A.Y., Naylor, S.L., Goeddel, D.G., Lawn, R.M.  
Clustering of leucocyte and fibroblast interferon genes on human chromosome 9  
Science 218, 1982, 374-374
- Sims, S.H., Cha, Y., Romine, M.F.  
A novel interferon inducible domain: Structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter  
Mol Cell Biol 13, 1993, 690-702
- Staeli, P., Haller, O., Boll, W., Lindenmann, J., Weissmann, C.  
Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus  
Cell 44, 1986, 147-158
- Stein, S., Kenny, C., Friesen, H.J., Shively, J., Del Valle, U., Pestka, S.  
NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of human fibroblast interferon  
Proc Natl Acad Sci USA 77, 1980, 5716-5719
- Thanos, D., Maniatis, T.  
The high mobility group protein HMG-I(Y) is required for NF-kappaB-dependent virus induction of the human IFN- beta gene  
Cell 71, 1992, 777-789
- Tilg, H., Mier, J.W., Vogel, W., Aulitzky, W.E., Wiedermann, C.J., Vannier, E., Huber, C., Dinarello, C.A.  
Induction of circulating IL-1 receptor antagonist by interferon treatment  
J Immunol 150, 1993, 4687-4692
- Uzé, G., Di Marco, S., Mouchel-Vielh, E., Monneron, D., Bandu, M.T., Horisberger, M.A., Dorques A., Lutfalla, G., Mogensen, K.E.  
Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components  
J Mol Biol 243, 1994, 245-257
- Walter, M.R.  
Three-dimensional models of interferon- $\alpha$  subtypes IFN-con 1, IFN- $\alpha$ 8, and IFN- $\alpha$ 1 derived from the crystal structure of IFN- $\alpha$ 2b  
Semin Oncol 24(suppl9), 1997, S9-52 - S9-62



Williams B.R.G., Silverman, R.H.  
The 2-5A System  
A.R. Liss, 1985, New York

Xu, X., Sun, Y-L, Hoey, T.  
Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred  
By the STAT amino terminal domain  
Science 273, 1996, 794-797

Yuen, M.F., Lai, C.L.  
Treatment of chronic hepatitis B  
Lancet Infect Dis 1(4), 2001, 232-241

Zürcher, T., Pavlovic, J., Staeheli, P.  
EMBO J 11, 1992, 1657-1661

## VII. Lebenslauf

### **Ines Burkard**

#### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 02.02.1975  
Geburtsort: München  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

#### **Schulbildung**

1981 – 1985 Grundsule in München - Solln  
1985 – 1991 Gymnasium Pullach  
1991 – 1994 Ludwigsgymnasium München  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### **Hochschulausbildung**

10/1994 – 3/1995 Chemie an der Ludwig Maximilians Universität München  
5/1995 – 3/1997 Vorklinisches Medizinstudium an der Ludwig Maximilians Universität München  
seit 5/1997 Klinisches Medizinstudium an der Technischen Universität München  
3/1997 Ärztliche Vorprüfung  
3/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
8/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2000 – 11/2001 Praktisches Jahr an der Technischen Universität München  
11/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2001 – 5/2003 Ärztin im Praktikum (Frauenklinik Bogenhausen, München)  
6/2003 – 12/2004 Assistenzärztin (Frauenklinik Bogenhausen, München)  
seit 1/2005 Assistenzärztin (Frauenklinik Dachau)

## **VIII. Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ewert Schulte-Frohlinde, für seine geduldige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und seine freundliche Unterstützung während der ganzen Zeit.

Besonderer Dank gilt Frau Barbara Seidler, die durch Ihre engagierte und selbstlose Arbeit im Labor wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug und jederzeit als konstruktive Diskussionspartnerin zur Verfügung stand.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter und meinen Freunden bedanken, für die Motivation und die Unterstützung, die zur Vollendung dieser Arbeit notwendig waren.