

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIII, 1

SECTIO C

1978

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS  
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zofia KRUCZEK-JUSZCZYK, Zbigniew KAWECKI

**Indukcja interferencji przez wirusowe kwasy nukleinowe  
w fibroblastach zarodka kury**

Индукция интерференции вирусными нуклеиновыми кислотами в фибробластах зародыша курицы

Interference Induction by Viral Nucleic Acids in Fibroblasts of the Chicken Embryo

Czynniki niewirusowe stymulujące produkcję interferonu w większości są polianionami. Do grupy polianionowych induktorów należą kwasy nukleinowe, polinukleotydy, plastyki, polisacharydy. Model syntezy interferonu przedstawiony przez Kleinschmidta (10) zakłada, że indukcja interferonu przez kwasy nukleinowe następuje na drodze derepresji, czyli odblokowania genu If przez indukujący kwas nukleinowy lub inny polianion. Zdolność interferogenna kwasów nukleinowych została przebadana zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Wykazano dużą aktywność interferonogenną induktorów.

MATERIAŁY

Szczepy wirusowe. Bakteriofag 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub>, wirulentny dla *Rh. meliloti* L<sub>8</sub>, otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Mikrobiologii i Biochemii UMCS od dr R. Staniewskiego, natomiast wirus mozaiki tytoniu — z Zakładu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie od doc. dr. K. Mieczyskiego, a wirus kleszczowego zapalenia mózgu szczep K<sub>5</sub> — z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku. Wirus krowianki pochodzi ze szczepionki otrzymanej z Wojewódzkiej Stacji „Sanepid” w Lublinie.

Szczep bakteryjny. *Rhizobium meliloti* L<sub>8</sub> otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Mikrobiologii i Biochemii UMCS od dr R. Staniewskiego.

Rośliny. *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum* typ Virginia otrzymano z IUNG w Puławach.

Zwierzęta doświadczalne. Myszy białe rasy Swiss-Albino wagi 10—12 g. Zarodki kurze rasy Leghorn 10-, 11-dniowe (do zakażeń na błonę kosmówkowo-omoczniową).

Hodowle tkankowe. Hodowlę fibroblastów zarodka kury uzyskano metodą trypsynowania z 9-, 10-dniowych zarodków. Hodowlę komórek Detroit-6 otrzymano z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku.

## METODY

### IZOLACJA DNA FAGA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> WIRULENTNEGO DLA RH. MELILOTI (DNA — FAGA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub>)

*Rh. meliloti* oraz faga namnażano w pożywce „5” Lairda (13). Dalszą preparatykę prowadzono wg metody opisanej przez Staniewskiego i współprac. (15). Następnie cząsteczki faga poddawano wirowaniu różnicowemu (6000 i 30 000 obr./min.), oczyszczając w ten sposób preparat. Czyste cząsteczki fagowe potraktowano fenolem w celu odbiałczenia. Warstwę kwasu nukleinowego zadawano eterem, a następnie przepuszczano lotny azot. Do tak przygotowanego preparatu dodawano alkohol 96% i DNA nawijano na bagietkę. Ilość DNA fagowego oznaczano metodą spektrofotometryczną. Aktywność biologiczną fagowego kwasu nukleinowego sprawdzano metodą transfekcji na hodowli kompetentnej.

### IZOLACJA DNA WIRUSA KROWIANKI (DNA-VACC)

DNA-vacc I. Wirus krowianki namnażano na hodowli komórek Dtr-6. DNA-vacc izolowano poprzez kilkakrotne zamrażanie (temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ ) i rozmrażanie zakażonej tkanki, stosując następnie preparatykę fenolową.

DNA-vacc II. Błonę kosmówkowo-omoczniową 11-dniowych zarodków kurzych zakażano wirusem krowianki. Po 72 godz. zbierano zainfekowane błony i zamrażano je w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ . Następnie rozcierano w moździerzu i homogenizowano z buforem Tris (1:2). Dalej zastosowano wirowanie różnicowe (2000 obr./min., 16 000 obr./min. w czasie 1 godz.). Oczyszczony i powtórnie zhomogenizowany osad poddawano dezintegracji ultradźwiękami i osadzono stosując 16 000 obr./min. w ciągu 1 godz. Zebrany osad w dalszej preparatyce poddawano obróbce zastosowanej przez Joklika (8), aż do momentu odbiałczenia.

Odbiałczenie przeprowadzono metodą fenolową na zimno jak w metodzie DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub>.

### IZOLACJA RNA Z WIRUSA MOZAIKI TYTONIU (RNA-WMT)

RNA-WMT. Suchą masę liściową ze zmianami mozaikowymi homogenizowano w roztworze wodnym i poddawano wysoleniu siarczanem amonu. Wytrącony osad poddawano preparatyce fenolowej, a następnie wytrącano alkoholem kwas nukleinowy w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

RNA-WMT II. Liście z rozległymi zmianami mozaikowymi przechowywano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ . Do izolacji RNA-WMT II zastosowano modyfikację metody Fraenkela-Conrata (4), wysalając duże ilości supernatantu siarczanem amonu. Po kilkunastogodzinnej dializie stosowano 4-krotne wirowanie różnicowe (6000 obr./min. w czasie 20 min. i 30 000 obr./min. w czasie 1 godz.). Osad homogenizowano i odbiałczano metodą fenolową na zimno.



## IZOLACJA RNA WIRUSA KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU (RNA-KZM)

Myszy białe rasy Swiss-Albino zakażano domózgowo wirusem KZM o mianie  $10^{7.77}LD_{50}/ml$ . Po wystąpieniu charakterystycznych objawów porażeniowych, myszy usypiano i preparowano mózgi. Wirus izolowano z 33% zawiesiny mózgowej o 0,02M buforze fosforanowym poprzez 3-krotne wirowanie różnicowe (12 000 obr./min. w czasie 20 min., 55 000 obr./min. w czasie 1 godz.). Dalej stosowano odbiałczenie wirusa metodą fenolową na zimno. Aktywność interferencyjna badanych kwasów nukleinowych była określana metodą opartą na zdolności tworzenia łąsinek (PFU). Probówki z hodowlą tkankową zakażano różnymi dawkami kwasów nukleinowych, przeliczając dawkę kwasu na 1 ml płynu. Tok doświadczalny opisano we wcześniejszej pracy (11).

## AKTYWNOŚĆ KWASÓW NUKLEINOWYCH PODDANYCH DZIAŁANIU NUKLEAZ

DNA poddawano działaniu dezoksyrybonukleazy 20  $\mu g/ml$  w czasie 30 min. w temperaturze pokojowej, RNA zadawano rybonukleazą 10  $\mu g$  na ml w czasie 15 min. w temp. 37°C. Dalej badano aktywność biologiczną kwasów nukleinowych poddanych działaniu nukleaz, wprowadzając je w dawkach wywołujących najlepszą interferencję.

## OKREŚLENIE IŁOŚCI KWASU NUKLEINOWEGO

Ilość DNA określano spektrofotometrycznie, przyjmując, że  $A$  przy długości fali równej 260 nm dla 50  $\mu g$  DNA równa się 1,0. Ilość RNA obliczano stosując wzór Hayashi i współprac. (7)

$$C_{RNA} = \frac{1}{25} (1,38 \times A_{260} - 0,79 \times A_{280})$$

We wszystkich przebadanych układach oznaczano obecność interferonu.

## WYNIKI INTERFERENCJI PRZY UŻYCIU RÓŻNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH

DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub>. We wcześniejszych badaniach (11), stosując nie oczyszczone preparaty DNA faga uzyskiwano wysoki stopień interferencji. Trudno było jednak określić jednoznacznie charakter induktora, który niewątpliwie zawierał, oprócz kwasów nukleinowych faga, inne składniki komórkowe (bakteryjne i fagowe). Badania właściwości interferencyjnych DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> wykonano stosując podaną technikę oczyszczania kwasu nukleinowego faga. Otrzymany DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> indukował interferencję prawie w takim samym stopniu jak DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> oczyszczony prostszą techniką (11).

Czas indukcji uległ skróceniu, a także optymalna dawka indukująca została zmniejszona w stosunku do aktywnego preparatu DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub>, który wcześniej przebadano i opisano (11). Maksymalną ochronę tkanki uzyskano po 3 godz. indukcji, stosując DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> w dawkach 1, 5,

10  $\mu\text{g/ml}$ , przy czym dawka 5  $\mu\text{g/ml}$  chroniła tkankę w najwyższym stopniu. Dawka 25  $\mu\text{g/ml}$  po 3 godz. inkubacji wykazywała obniżenie interferencji, a po 6 godz. działała toksycznie na tkankę. Ten sam efekt toksyczny stwierdzono już po 2 godz. inkubacji, stosując dawkę 50  $\mu\text{g/ml}$ .

DNA-vacc II. W dawce 5  $\mu\text{g/ml}$  na FZK wykazywał maksimum interferencji po 3 godz. inkubacji hodowli. Niewiele niższą interferencję obserwowano po 6 godz. inkubacji, a po 12 godz. występował wyraźny spadek ochrony tkanki. Zwiększenie dawki DNA-vacc II do 25  $\mu\text{g/ml}$  oraz przedłużenie czasu inkubacji powodowało obniżenie stopnia interferencji.

DNA-vacc I. Maksimum interferencji wykazywał na FZK w dawce 10—25  $\mu\text{g/ml}$  po 10 godz. inkubacji hodowli. Po 18 godz. inkubacji występował już wyraźny spadek. Zwiększenie dawki do 50  $\mu\text{g/ml}$  powodowało obniżenie poziomu interferencji.

Porównując wyniki uzyskane z DNA-vacc I i DNA-vacc II stwierdza się również duże różnice w wielkości efektywnej dawki i w długości okresu indukcji. Czas indukcji w przypadku DNA-vacc II był 3-krotnie krótszy niż w przypadku DNA-vacc I, a najefektywniejsza dawka analogicznie zmniejszała się 5-krotnie.

RNA-WMT I. Początkowe badania wykazywały wysoką ochronę FZK. Najlepsze wyniki uzyskano stosując dawkę 25  $\mu\text{g/ml}$  oraz czas indukcji 12 godz. Po 18 godz. poziom interferencji stymulowany przez ten kwas utrzymywał się mniej więcej na tym samym poziomie jak po 6 godz. inkubacji, po 24 godz. interferencja zanikała prawie całkowicie.

RNA-WMT II. Maksymalna ochrona tkanki na FZK pojawiła się po 6 godz. inkubacji, jeśli stosowano dawkę 10  $\mu\text{g/ml}$ . Zwiększenie dawki do 25  $\mu\text{g/ml}$  wykazywało obniżenie działania ochronnego o 20% w stosunku do maksymalnej interferencji.

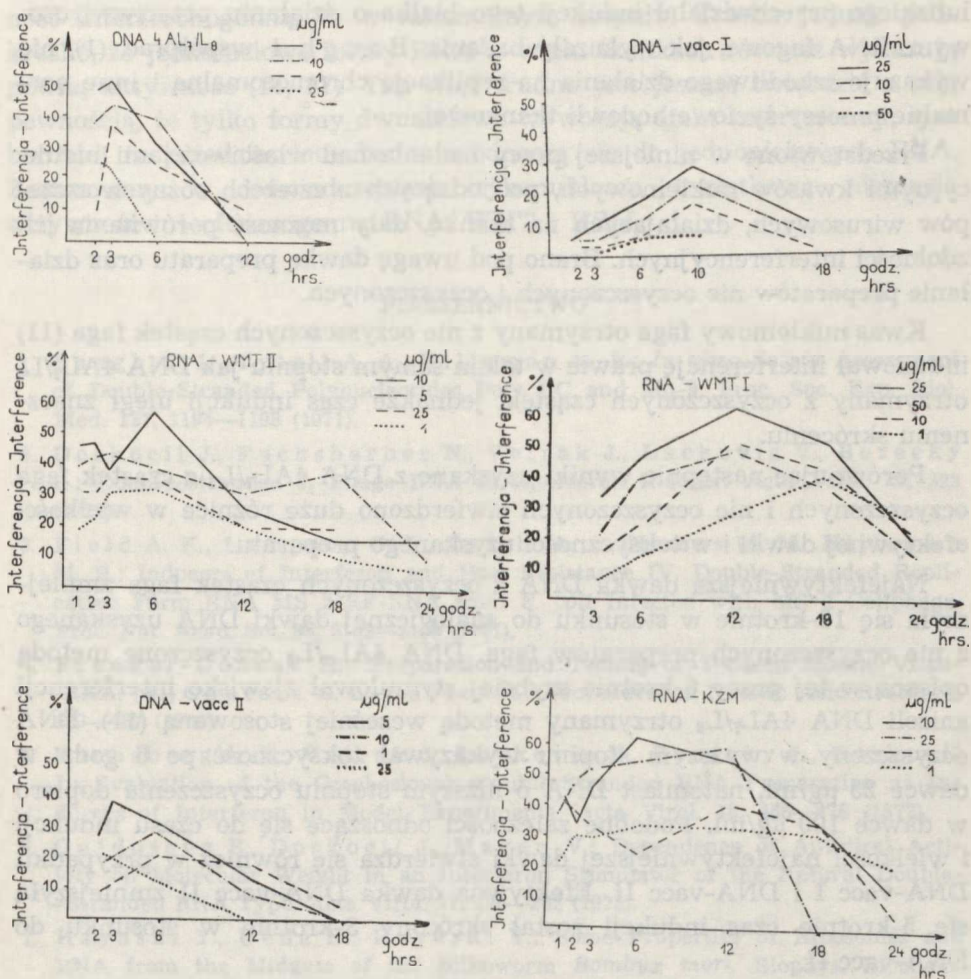
RNA-KZM. Najlepszą interferencję obserwowano po 6 godz. inkubacji hodowli FZK kwasu nukleinowego w dawce 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ochrona tkanki dochodziła do 60%. Równie efektywna była dawka 25  $\mu\text{g/ml}$  po 12 godz. inkubacji. Inne przebadane dawki RNA-KZM dawały ochronę tkanki mniejszą, w granicach 40% interferencji.

Wszystkie badane kwasy nukleinowe powodowały produkcję interferonu, co zostało stwierdzone we wszystkich przypadkach. Uzyskano bardzo wysokie miana interferencji, do 200 jedn. If/ml.

#### DYSKUSJA

Doświadczalnie udało się wykazać efektywność kwasów nukleinowych jako induktorów interferencji. Spośród naturalnych kwasów nukleinowych główną uwagę zwrócono na genomy fagów *E. coli* Mu9 (1, 12), MS2 (3, 9, 17), f<sub>2</sub> (2, 5, 6).





Ryc. 1. Interferencja w hodowli fibroblastów zarodka kury w zależności od zastosowanego induktora

Interference in fibroblasts' culture of the chicken embryo depending on the inducer used

Fuchsberger i współprac. (5) przebadali wpływ RNA  $f_2$  na indukcję interferonu w dawkach 10—50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  w układzie *in vitro*. Stwierdzili oni stymulację interferonu jedynie w hodowli otrzewnowych leukocytów mysich. Natomiast w ludzkich komórkach obserwowano niski stopień produkcji tego czynnika przeciwwirusowego, a w komórkach mysich L i FZK (2, 5) nie stwierdzono indukcji interferonu.

RNA fagowy może działać w dwojaki sposób, zależny od rodzaju tkanki. Kawade i współprac. (9) wykazali, że badany przez nich RNA MS2 w tkance FZK indukował interferon, natomiast w fibroblastach płuca

ludzkiego przeciwdziałał indukcji tego białka o działaniu przeciwwirusowym. RNA fagowe, jak wykazały badania B a u g h i współprac. (1), nie wykazuje szkodliwego działania na replikację chromosomalną i inne normalne procesy życiowe hodowli tkankowej.

Przedstawione w niniejszej pracy badania nad właściwościami indukcyjnymi kwasów nukleinowych, pochodzących z czterech różnych szczepów wirusowych, działających na tkankę, dały możliwość porównania ich zdolności interferencyjnych. Brano pod uwagę dawkę preparatu oraz działanie preparatów nie oczyszczonych i oczyszczonych.

Kwas nukleinowy faga otrzymany z nie oczyszczonych cząstek faga (11) indukował interferencję prawie w takim samym stopniu jak DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> otrzymany z oczyszczonych cząstek, jednakże czas indukcji uległ znacznemu skróceniu.

Porównując następnie wyniki uzyskane z DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> z cząstek faga oczyszczonych i nie oczyszczonych stwierdzono duże różnice w wielkości efektywnej dawki i w toksyczności uzyskanego preparatu.

Najefektywniejsza dawka DNA z oczyszczonych cząstek faga zmniejszyła się 10-krotnie w stosunku do analogicznej dawki DNA uzyskanego z nie oczyszczonych preparatów faga. DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> oczyszczone metodą opisaną w tej pracy 6-krotnie szybciej stymulował zjawisko interferencji aniżeli DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> otrzymany metodą wcześniej stosowaną (11). DNA oczyszczony w wyższym stopniu wykazywał toksyczność po 6 godz. w dawce 25 µg/ml, natomiast DNA o niższym stopniu oczyszczenia dopiero w dawce 100 µg/ml. Podobne zależności odnoszące się do czasu indukcji i wielkości najefektywniejszej dawki stwierdza się również w przypadku DNA-vacc I i DNA-vacc II. Efektywna dawka DNA-vacc II zmniejszyła się 5-krotnie czas indukcji został skrócony 3-krotnie w stosunku do DNA-vacc II.

Porównując wyniki zdolności interferencyjnej kwasu nukleinowego RNA-WMT I i RNA-WMT II stwierdzono tę samą zależność, jaką wykazano w przypadku DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub>, oraz DNA-vacc I i DNA-vacc II. Niska czystość i niejednorodność preparatu powoduje konieczność stosowania wyższych dawek kwasu nukleinowego i przedłużenia czasu indukcji interferonu.

Toksyczny wpływ kwasów nukleinowych wykazano tylko przy działaniu DNA na FZK. Zarówno DNA-vacc., jak i DNA 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> były toksyczne w dawce 50 µg/ml. Toksyczności kwasów nukleinowych nie stwierdzono.

Większość badaczy skłania się ku twierdzeniu, że indukcję interferencji wywołują dwuniciowe formy kwasów nukleinowych. Wiele badań wykazuje dużą efektywność właśnie tych form, lecz tylko w przypadku kwasów rybonukleinowych. DNA, mimo że dwuniciowe, jeśli posiada aktyw-



ność interferonogenną, to w minimalnym stopniu. Trzeba jednak podkreślić, że jednoniciowe formy RNA w wielu tkankach również wykazują pewną aktywność (14, 17). Tak więc trudno jest jeszcze twierdzić z całą pewnością, że tylko formy dwuniciowe wywołują efekt interferencji, tym bardziej że przedstawione badania odnoszą się do jednoniciowych RNA. Zastosowana w doświadczeniach rybonukleaza trzustkowa niszczyła aktywność interferonogenną RNA, WMT i KZM.

## PIŚMIENICTWO

1. Baugh C. L., Tytell A. A., Hilleman M. R.: *In vitro* Safety Assessment of Double-Stranded Polynucleotides Poly I:C and Mu-9. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **137**, 1194—1198 (1971).
2. Daskocil J., Fuchsberger N., Vetrak J., Lackovic V., Borecky L.: Double-Stranded  $f_2$  Phage RNA as Interferon Inducer. *Acta Virol.* **15**, 523 (1971).
3. Field A. K., Lampson G. P., Tytell A. A., Nemes M. M., Hilleman M. R.: Inducers of Interferon and Host Resistance IV. Double-Stranded Replicative Form RNA MS 2-RF-RNA from *E. coli* Infected with MS 2 Coliphage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **58**, 2102—2108 (1967).
4. Frenkel-Conrat H.: Preparation and Testing of Tobacco Mosaic Virus-RNA. [w:] Cantoni C. L., Davies R.: *Procedures in Nucleic Acid Research*, 480—487 (1966).
5. Fuchsberger N., Vetrak J., Lackovic V., Borecky L., Daskocil J.: Evaluation of the Czechoslovak Double-Stranded RNA Preparation as Inducers of Interferon in Model Experiments. *Acta Virol.* **16**, 466—476 (1972).
6. Gajdosova E., Daskocil J., Mayer V.: Dependence of Antiviral Activity on Molecular Weight in an Interferon Stimulator of the Natural Double-Stranded RNA Type. *Acta Virol.* **17**, 196—202 (1973).
7. Hayashi Y., Ueda K., Hayashi Y.: Some Properties of Ribosomes and RNA from the Midguts of the Silkworm *Bombyx mori*. *Biophys. Biochem. Acta* **119**, 84 (1966).
8. Joklik W. K., Merigan T. C.: Concerning the Mechanism of Action of Interferon. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **56**, 558—565 (1966).
9. Kawade Y., Matsuyama M., Yamamoto Y., Ozaki H.: Antagonism of Non-Inducer Ribonucleic Acid against Induction of Antiviral Cell Resistance and Interferon by Inducer Ribonucleic Acid. *Japan J. Microb.* **16**, 501—513 (1972).
10. Kleinschmidt W. J.: Biochemistry of Interferon and its Inducers. *Annual Review of Biochem.* **41**, 517—542 (1972).
11. Kruczek-Juszczak Z., Kandefer-Szerszeń M., Kawecki Z.: Phage DNA as Interferon Inducer. *Acta Microb. Pol.* **22**, 169—173 (1973).
12. Lago B. D., Birnbaum J., Demain A. L.: Fermentation Process for Double-Stranded Ribonucleic Acid an Interferon Inducer. *App. Microb.* **24**, 430—436 (1972).
13. Laird D. G.: Bacteriophage and the Root Nodule Bacteria. *Arch. Microbiol.* **3**, 159 (1932).

14. Musci I., Pusztai R., Beladi I., Bakay M.: Production of High Titres of Interferon in Chicken Leukocyte Cultures Inoculated with Human Adenovirus Type 12. *Acta Virol.* **14**, 453—458 (1970).
15. Staniewski R., Lorkiewicz Z., Chomicka Z.: Transfection of *Rhizobium meliloti*. *Acta Microbiol. Pol. seria A*, **3** (20), 97—100 (1971).
16. Summers D. F.: The Isolation and Properties of High Molecular Weight RNA from Poliovirus. [w:] Cantoni G. L., Davies R.: *Procedures in Nucleic Acid Research*, 488—492 (1966).
17. Ujihara M., Kawade Y., Ozaki O., Matsuzawa T.: Interference with Animal Virus Infection Induced in Cultured Cells by RNA. *Ann. Rep. of Inst. for Virus Res. Kyoto Univ.* **11**, 59 (1968).

#### РЕЗЮМЕ

На фибробластах зародыша курицы исследовались интерференционные способности четырех нуклеиновых кислот, полученных из четырех разных вирусов: RNA вируса мозаики табака, RNA вируса клещевого воспаления мозга, DNA бактериофага 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> *Rhizobium meliloti*, DNA вируса оспенного детрита.

Обе рибонуклеиновые кислоты оказались лучшими индукторами интерференции, чем дезоксирибонуклеиновые кислоты. Обнаружены большие различия в индукции явления интерференции через препараты очищенных и неочищенных нуклеиновых кислот. Низкая чистота и неоднородность препарата вызывают необходимость применения больших доз нуклеиновых кислот и удлиняют время индукции интерферона.

#### SUMMARY

Interference capacity of the four nucleic acids from four different viruses was studied on fibroblasts of the chicken embryo: RNA of Tobacco Mosaic Virus, RNA of Tick-Borne Encephalitis Virus, DNA of 4AL<sub>7</sub>/L<sub>8</sub> *Rhizobium meliloti* bacteriophage, DNA of Vaccinia Virus.

Both ribonucleic acids appeared to be better interference inductors than deoxyribonucleic acids. Great differences in interferences induction by the preparations of purified and nonpurified nucleic acids were shown. A low purity and heterogeneity of the preparation required the use of higher doses of the nucleic acid and made the induction time of the interferon longer.