

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zofia KRUCZEK-JUSZCZYK, Zbigniew KAWECKI,
Irena ŁOKAJ

**Indukcja interferencji przez wirusowe kwasy nukleinowe
w komórkach Detroit-6**

Индукция интерференции вирусными нуклеиновыми кислотами в клетках
Detroit-6

Interference Induction by Viral Nucleic Acids in Detroit-6 Cells

Czynniki przeciwwirusowe stanowią obecnie przedmiot zainteresowań wielu badaczy. Szczególną uwagę zwraca się na naturalne substancje przeciwwirusowe. Do nich zalicza się dwuniciowe RNA izolowane z wirusów bakteryjnych *Escherichia coli*: MS (8, 12, 21), Mu9 (3, 17), f₂ (7, 10, 11), T4 (15), z wirusów grzybowych: *Penicillium funiculosum* (18), *Penicillium stoloniferum* (1, 2, 4, 13, 14), *Penicillium chrysogenum* Q 176 (5) oraz innych mykofagów (6).

W produkcji interferonu dużą rolę odgrywa dobór odpowiedniego induktora, ale nie mniejsze znaczenie ma zastosowana tkanka. Postanowiono przebadać indukcję interferonu pod wpływem różnych wirusowych kwasów nukleinowych w komórkach linii ciągłej pochodzenia ludzkiego.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy wirusowe, bakteryjne, rośliny, zwierzęta doświadczalne i hodowle tkankowe oraz metody izolacji kwasów nukleinowych i ich oznaczenia podano w poprzedniej pracy (16).

WYNIKI INTERFERENCJI PRZY UŻYCIU RÓŻNYCH KWASÓW
NUKLEINOWYCH

DNA 4AL₇/L₈. Interferencję najwyższego stopnia stwierdzono w dawce 25 µg/ml po 12 godz. inkubacji z badanymi komórkami. Zwiększenie dawki DNA do 50 µg/ml prowadziło do obniżenia zdolności interferencyjnej. Nie obserwowano toksycznego działania badanego kwasu nukleinowego na komórki Dtr-6 nawet przy zwiększeniu inkubacji do 18 godz. Obserwując indukcję interferonu przez DNA 4AL₇/L₈ stwierdzono załamanie się mechanizmu ochronnego po 6 godz. działania badanego induktora na tkankę. Dotyczyło to wolnych stężeń induktora. Stwierdzono również, że większe stężenia induktora (10, 25, 50 µg/ml) powodowały powstawanie łąsinek o średnicy 1—1,5 mm, czyli dwukrotnie większych aniżeli w kontroli wirusa dokażającego.

DNA-vacc II. W hodowli komórek Dtr-6 badany kwas nukleinowy był również dobrym induktorem interferencji. Wykazywał maksymalne działanie ochronne po 12 godz. inkubacji przy wprowadzeniu dawki 50 µg/ml. Podobnie do DNA 4AL₇/L₈ również DNA-vacc II po 6 godz. inkubacji z komórkami Dtr-6 wykazywał zmniejszony stopień interferencji we wszystkich badanych dawkach. Obserwowano znaczną interferencję po 3 godz. inkubacji hodowli z DNA, spadek po 6 godz., a następnie wzrost do maksymalnych wartości po 12 godz., oraz zanik działania ochronnego po 18 godz. indukcji.

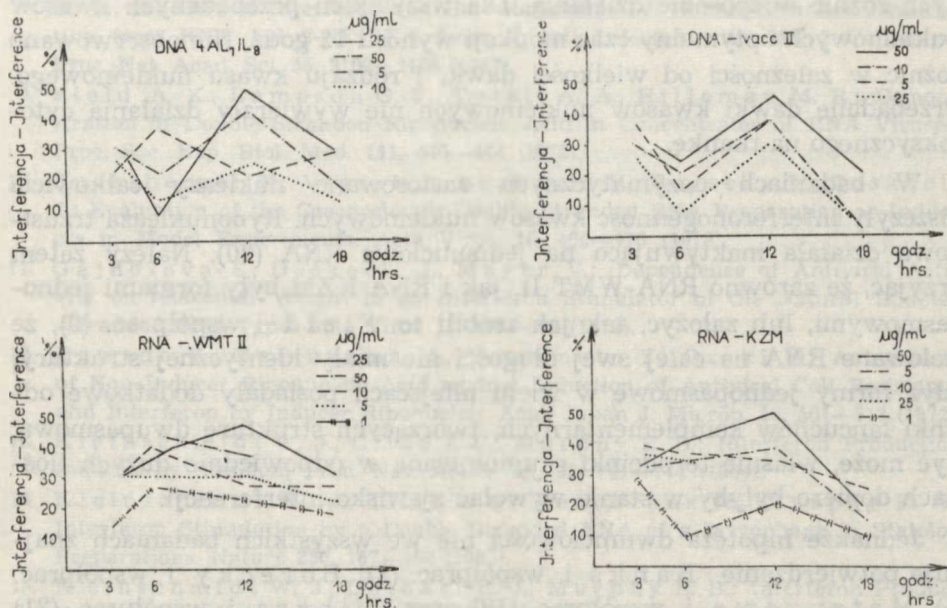
RNA-WMT II. Dynamika narastania interferencji pod wpływem RNA-WMT II w hodowlach komórek Dtr-6 wykazywała inny przebieg aniżeli dynamika interferencji obserwowana w tej samej hodowli komórkowej pod wpływem DNA-vacc II i DNA 4AL₇/L₈. Najbardziej efektywna okazała się dawka 25 µg/ml po 12 godz. inkubacji z badaną tkanką. Przedłużenie czasu inkubacji oraz zwiększenie dawki kwasu nukleinowego obniża jego działanie ochronne.

RNA-KZM. Interferencja stymulowana przez RNA-KZM we wszystkich badanych dawkach układała się prawie na tym samym poziomie po 3, 6 i 12 godz. inkubacji, a po 18 godz. ulegała zanikowi. Stały poziom ochronny po zadziałaniu przebadanymi dawkami RNA-KZM przewyższała w niewielkim stopniu (10%) jedynie dawka najwyższa, tj. 50 µg/ml po 12 godz. inkubacji.

Kwasy nukleinowe w hodowlach komórek Dtr-6 nie wykazywały różnic w efektywności działania. Dla wszystkich przebadanych kwasów nukleinowych optymalny czas indukcji z tkanką wynosił 12 godz., a interferencja wahała się w granicach 46—48,5%. Nie obserwowano różnic w zależności od wielkości dawki i rodzaju kwasów nukleinowych. Przebadane dawki kwasów nukleinowych nie wywierały działania cytotoksycz-

nego na tkankę. Wszystkie przedstawione doświadczenia powtórzono 3-, 4-krotnie.

Stwierdzono, że zjawisko interferencji badanych kwasów nukleinowych wywoływał interferon, jakkolwiek miana interferonu były bardzo niskie (15—50 jedn. If/ml). Przebadane kwasy nukleinowe poddano działaniu nukleaz. DNA pod wpływem DNazy i RNA pod wpływem RNazy traciły całkowicie swą aktywność interferonogenną.



Ryc. 1. Interferencja w hodowli komórek Detroit-6 w zależności od zastosowanego induktora

Interference in Detroit-6 cells culture depending on the inducator used

DYSKUSJA

Hipoteza Isaacs'a, że obcy kwas nukleinowy jest dobrym induktorem interferonu, znalazła potwierdzenie w wielu badaniach.

Wykrycie przez Kleinschmidta (14) w preparacie statolonu obecności cząsteczek wirusowych RNA przyczyniło się do zainteresowania się hipotezą Isaacs'a. Również przyczyniły się do rozwiązywania tego problemu badania O'Della, Rotema, Jensena, Takano, Mayera, Luc Montagniera, wykazujące, że wprowadzenie kwasów nukleinowych do badanego systemu *in vivo* czy *in vitro* obniża śmiertelność zwierząt lub chroni częściowo tkankę przed infekcją wirusową.

Na podstawie doświadczeń udało się wykazać efektywność kwasów nukleinowych jako induktorów interferencji *in vitro*. Najlepszą ochronę tkanki pod wpływem obu RNA stwierdzono po 12 godz., ale dawki dające najlepszą ochronę tkanki były różne. Ten sam poziom interferencji uzyskiwano stosując 25 µg/ml RNA-WMT i 50 µg/ml RNA-KZM. Po osiągnięciu maksimum pod wpływem wymienionych dawek w optymalnym czasie poziom interferencji uległ obniżeniu.

Kwasy nukleinowe w hodowli komórek Dtr-6 nie wykazywały wyraźnych różnic w sposobie działania. Dla wszystkich przebadanych kwasów nukleinowych optymalny czas indukcji wynosił 12 godz. Nie obserwowano różnic w zależności od wielkości dawki i rodzaju kwasu nukleinowego. Przebadane dawki kwasów nukleinowych nie wywierały działania cytotoksycznego na tkankę.

W badaniach enzymatycznych zastosowane nukleazy całkowicie niszczyły interferonogenność kwasów nukleinowych. Ryonukleaza trzustkowa działała inaktywująco na jednoniciowe RNA (20). Należy zatem przyjąć, że zarówno RNA-WMT II, jak i RNA-KZM były formami jednopasmowymi, lub założyć, tak jak zrobili to Field i współprac. (9), że izolowane RNA na całej swej długości nie miały identycznej struktury, gdyż formy jednopasmowe w wielu miejscach posiadały dodatkowe odcinki łańcuchów komplementarnych, tworzących strukturę dwupasmową. Być może, właśnie te odcinki skumulowane w odpowiednio dużych ilościach dopiero byłyby w stanie wywołać zjawisko interferencji.

Jednakże hipoteza dwuniciowości nie we wszystkich badaniach znajduje potwierdzenie. Banks i współprac. (2), Borecky i współprac. (4), Matsuyama i współprac. (19) oraz Ujihara i współprac. (21) wykazali efektywność form jednoniciowych. Podobne wyniki uzyskaliśmy również w tej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen L. B., Cochran K. W.: Target — Organ Treatment of Neurotropic Virus Disease with Interferon Inducers. *Infect. Immun.* 6 (5), 819—823 (1972).
2. Banks G., Buck K. W., Chain E. B., Himmelweit F., Marks J. E., Tylen J. W., Hollings M., Last F., Stone O.: Viruses in Fungi and Interferon Stimulation. *Nature* 218, 542—545 (1968).
3. Baugh C. L., Tytell A. A., Hilleman M. R.: *In vitro* Safety Assessment of Double-Stranded Polynucleotides Poly I:C and Mu9. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137, 1194—1198 (1971).
4. Borecky L., Laskovic V., Fuchsberger N.: Comparison on Interferon Production in Mouse Leukocytes by Statolon and Complexed Polyribonucleotide Poly I:C. *Acta Virol.* 14, 329—336 (1970).

5. Buck K. W., Chain E. B., Himmelweit F.: Comparison of Interferon Induction in Mice by Purified *Penicillium chrysogenum* Virus and Derived Double-Stranded RNA. *J. Gen. Virol.* **12**, 131—139 (1971).
6. De Clerq E.: Hyporeactivity to Interferon Production by Double-Stranded RNA Associated with Hyporeactivity to Antiviral Protection and Hyporeactivity to Toxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **141**, 340—345 (1972).
7. Dorskocil J., Fuchsberger N., Vetrak J., Laskovic V., Borecky L.: Double-Stranded ϕ_2 Phage RNA as Interferon Inducer. *Acta Virol.* **15**, 523 (1971).
8. 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 from RNA MS 2-RF-RNA from *E. coli* Infected with MS 2 Coliphage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **58**, 2102—2108 (1967).
9. Field A. K., Lampson G. P., Tytell A. A., Hilleman M. R.: Demonstration of Double-Stranded Ribonucleic Acid in Concentrates of RNA Viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **141**, 440—444 (1972).
10. Fuchsberger N., Vetrak J., Lackovic V., Borecky L., Dorskocil J.: Evaluation of the Czechoslovak Double-Stranded RNA Preparation as Inducers in Model Experiments. *Acta Virol.* **16**, 466—476 (1972).
11. Gajdosova E., Dorskocil 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).
12. 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).
13. Kleinschmidt W. J., Cline J. C., Murphy E. B.: Interferon Production Induced by Statolon. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **52**, 741—744 (1964).
14. Kleinschmidt W. J., Ellis L. F., Van Frank M., Murphy E. B.: Interferon Stimulation by a Double-Stranded RNA of a Mycophage in Statolon Preparations. *Nature* **220**, 167—168 (1968).
15. Kleinschmidt W. J., Dothart R. J., Murphy E. B.: Interferon Production by T4 Coliphage. *Nature* **228**, 27—30 (1970).
16. Kruczek - Juszczyk Z., Kaweckie Z.: Indukcja interferencji przez wirusowe kwasy nukleinowe w fibroblastach zarodka kury. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **33**, 1—8 (1978).
17. Lago B. D., Birnbaum J., Demain A. L.: Fermentation Process for Double-Stranded Ribonucleic Acid, an Interferon Inducer. *App. Microb.* **24**, 430—436 (1972).
18. Lampson G. P., Tytell A. A., Field A. K., Nemes M. M., Hilleman M. R.: Inducers of Interferon and Host Resistance I. Double-Stranded RNA from Extracts of *Penicillium funiculosum*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **58**, 782—789 (1967).
19. Matsuyama M., Ozeki H., Yamamoto Y., Ohwaki M., Kawade Y.: Induction of Viral Interference in Animal Cells by Exogenous RNA. *Ann. Rep. of Inst. Virus Res. Kyoto Univ.* **12**, 141 (1969).
20. Petryniak J.: Zastosowanie nukleaz do badania struktury i biologicznej aktywności RNA i DNA. *Post. Biochem.* **13**, 391—418 (1972).
21. 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

Исследовалась индукция интерферона под влиянием вирусных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот в клетках сплошной линии человеческого происхождения Detroit-6. Все эти нуклеиновые кислоты проявляли наилучшую индукцию интерференции через 12 часов после инкубации.

Не наблюдались различия в индукции интерференции, зависящие от величины дозы и вида нуклеиновой кислоты. Максимальная степень получаемой интерференции колебалась в границах 46—48,5% предохранения ткани.

SUMMARY

Interferon induction under the influence of viral ribonucleic and deoxyribonucleic acids in Detroit-6 cells was examined. All acids showed the best interference induction after 12 hr of incubation.

No differences in interference induction were found to depend on the dose size or the kind of nucleic acid. The maximum rate of the interference obtained ranged from 46—48.5% of tissue protection.