

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIII, 4

SECTIO C

1978

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zofia KRUCZEK-JUSZCZYK, Zbigniew KAWECKI

**Porównanie zdolności interferencyjnych kwasów nukleinowych
w hodowli komórek Detroit-6 i fibroblastach zarodka kury**

Интерференционные способности нуклеиновых кислот в культуре клеток
Detroit-6 и фибробластах зародыша курицы

Comparison of Interference Capacity of Nucleic Acids in the Culture of Detroit-6
Cells and in Fibroblasts of the Chicken Embryo

Od dłuższego czasu poszukuje się induktorów powodujących wytworzenie dużych ilości interferonu. Induktory takie są aktywne w różnych układach i systemach komórkowych. Jakkolwiek rośnie ich liczba, to stwierdza się ciągle jeszcze brak odpowiedniego czynnika, który stymulowałaby produkcję interferonu w zadowalającym stopniu, a tym samym zabezpieczałby organizm ludzki czy zwierzęcy przed infekcją wirusową.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy wirusowe, bakteryjne, rośliny, zwierzęta doświadczalne, hodowle tkankowe oraz metody izolacji kwasów nukleinowych i ich oznaczenia przedstawiono we wcześniejszej pracy (12).

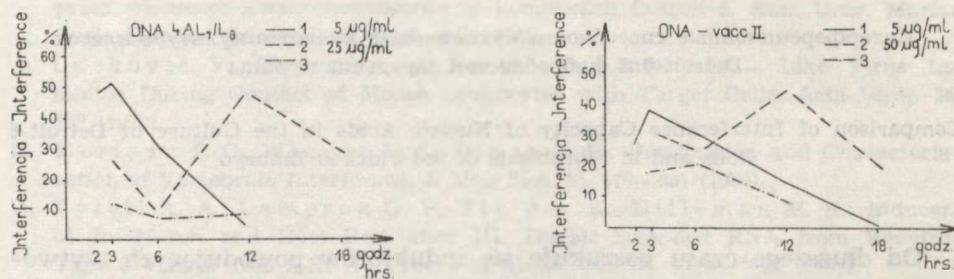
WYNIKI

W celu dokonania dokładniejszej interpretacji doświadczeń, przedstawionych w dwu poprzednich pracach (12—13), wybrano i porównano najefektywniejsze dawki kwasów nukleinowych powodujących maksymalną interferencję na FZK i Dtr-6.

Stosując DNA 4AL₇/L₈ w dawce 5 µg/ml na FZK otrzymano szczyt

interferencyjny już po 3 godz. inkubacji, natomiast w hodowli komórek Dtr-6 szczyt ochrony o tej samej aktywności stwierdzono dopiero po 4-krotnie dłuższej inkubacji z tkanką (ryc. 1).

DNA-vacc II, podobnie do DNA 4AL₇/L₈, dawał inny przebieg interferencji na tkance pierwotnej, a inny na linii ciągłej. W przypadku indukcji interferencji na FZK ochrona tkanki była wyższa o 10% niż w hodowli komórek Dtr-6 po 3 i 6 godz. indukcji. Maksymalny procent interferencji na Dtr-6 otrzymano pod wpływem 10-krotnie wyższej dawki DNA-vacc II niż na hodowli FZK. Indukcja interferencji na FZK pod wpływem DNA-vacc II wymagała krótszego czasu inkubacji tak samo jak w przypadku DNA 4AL₇/L₈ maksimum osiągała po 3 godz. W hodowli komórek Dtr-6 niewiele wyższe maksimum interferencji stwierdzono po 4-krotnie dłuższym czasie inkubacji (ryc. 1).



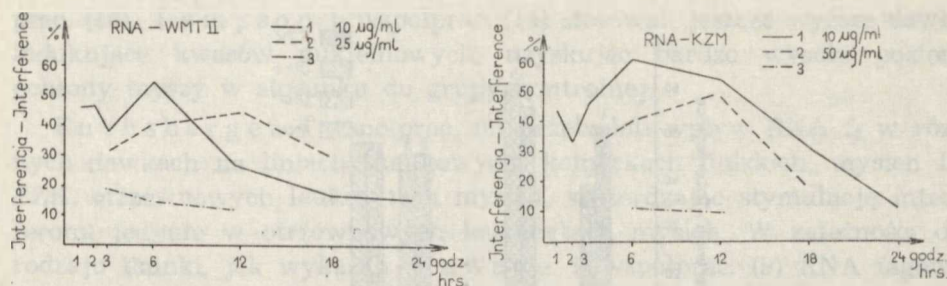
Ryc. 1. Aktywność interferencyjna DNA 4AL₇/L₈ i DNA-vacc II; 1 — w hodowli komórek fibroblastów zarodka kury, 2 — w hodowli komórek Dtr-6, 3 — pod wpływem działania DNazy

Interference activity of DNA 4AL₇/L₈ and DNA-vacc II; 1 — in fibroblasts' culture of the chicken embryo, 2 — in the culture of Dtr-6 cells, 3 — under the influence of DN-ase

RNA-WMT II FZK indukuje najwyższą interferencję przy zastosowaniu dawki 10 µg/ml, natomiast w hodowli komórek Dtr-6 najwyższy stopień ochrony uzyskano stosując dawkę 25 µg/ml, czyli 2,5-krotnie wyższą ilość kwasu nukleinowego (ryc. 2).

Interferencja wywołana pod wpływem RNA-KZM na tkance pierwotnej była wyższa aniżeli w hodowli komórek Dtr-6. Mimo zastosowania 5-krotnie wyższej dawki maksimum interferencji pod wpływem RNA-KZM w hodowli komórek Dtr-6 było o 12% niższe od maksimum interferencji na FZK (ryc. 2).

Wszystkie przebadane kwasy nukleinowe wywoływały interferencję zarówno na tkance pierwotnej, jak i na linii ciągłej. Interferencja wywołana przez DNA była niska, zwłaszcza w przypadku DNA wirusa krowianki (DNA-vacc I i II) na FZK. Ochrona FZK przez oba przebadane RNA była



Ryc. 2. Aktywność interferencyjna RNA—WMT II i RNA—KZM; 1 — w hodowli komórek fibroblastów zarodka kury, 2 — w hodowli komórek Dtr-6, 3 — pod wpływem działania RNazy

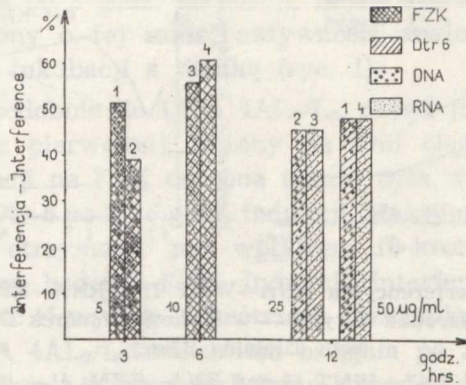
Interference activity of RNA—WMT II and RNA—KZM; 1 — in fibroblasts' culture of the chicken embryo, 2 — in the culture of Dtr-6 cells, 3 — under the influence of RN-ase

tylko w niewielkim procencie wyższa od ochrony wywołanej przez DNA. Ochrona Dtr-6 indukowana przez RNA i DNA przy najefektywniejszych dawkach ustalała się na jednym poziomie, nie przekraczając 50% interferencji po 12 godz. inkubacji.

Optymalne dawki kwasów nukleinowych, konieczne do indukcji interferencji na tkance Dtr-6, były duże. W przypadku DNA-vacc II i RNA-WMT II wynosiły 25 µg/ml, a w przypadku RNA-KZM i DNA faga 50 µg/ml. Nie stwierdzono istotnych różnic w indukcji interferencji przez DNA i RNA w hodowli komórek Dtr-6. Interferencja wywołana przez RNA i DNA na FZK była bardziej zróżnicowana. Pod wpływem DNA stwierdzono niską ochronę, RNA chronił tkankę w wyższym stopniu. Stosując RNA jako induktor, otrzymano najwyższy stopień ochrony tkanki (61,5%). Dawki kwasów nukleinowych potrzebne do indukcji interferencji na FZK były dużo niższe niż w komórkach Dtr-6. DNA 4AL₇/L₈ i DNA-vacc II powodują najwyższą ochronę po 3 godz. przy dawce 5 µg/ml, a RNA-WMT II i RNA-KZM po 6 godz. przy dawce 10 µg/ml (ryc. 3).

Komórki FZK były bardziej wrażliwe na interferencyjne działanie kwasów nukleinowych aniżeli Dtr-6. Na obu przebadanych tkankach otrzymano ok. 50% ochrony, jednakże dawki kwasów nukleinowych indukujące interferencję były 2,5-, 5-, 10-krotnie wyższe na Dtr-6 aniżeli stosowane na FZK.

Na ryc. 1—2 przedstawiono również wykresy aktywności interferencyjnej omawianych kwasów nukleinowych poddanych działaniu nukleaz. Nukleazy całkowicie redukowały aktywność interferencyjną badanych kwasów nukleinowych. We wszystkich przebadanych interferencjach stwierdzono obecność interferonu.



Ryc. 3. Maksymalne zdolności interferonogenne kwasów nukleinowych w hodowlach komórkowych fibroblastów zarodka kury i Dtr-6; 1 — DNA 4AL₇/L₈, 2 — DNA-vacc II, 3 — RNA—WMT II, 4 — RNA—KZM

Maximum interference capacities of nucleic acids in the culture of Detroit-6 cells and in fibroblasts of the chicken embryo; 1 — DNA 4AL₇/L₈, 2 — DNA-vacc II, 3 — RNA—WMT II, 4 — RNA—KZM

DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach wykazano efektywność kwasów nukleinowych jako interferonogenów. Przebadanie interferencji pod wpływem dwu kwasów nukleinowych pochodzących z różnych wirusów patogennych dla zwierząt, człowieka, roślin i bakterii w dwu tkankach: pierwotnej i ciągłej, pozwala na dokładniejszą obserwację interferencji i znalezienie bardziej optymalnych warunków wywołujących to zjawisko. Użytkany poziom interferencji zależny był od rodzaju kwasu nukleinowego, jego dawki, czasu indukcji i rodzaju tkanki. Badania Tytella i współprac. (17) z RNA Reo-3 wykazały, że już dawka 0,4 µg RNA zabezpieczała jednowarstwową hodowlę tkankową nerki królika przed wirusem VSV. Również niewielka dawka 0,5 µg tego preparatu podana królikom dawała maksimum produkcji interferonu już po 2 godz.

Podobne dane przedstawili również w swojej pracy Field i współprac. (6) z MS2-RF-RNA, indukując interferon u królików. Jednakże szczyt produkcji interferonu stwierdzili po 4 godz.

Doskocil i współprac. (5) oraz Fuchsberger i współprac. (8) stosowali 10-krotnie większą dawkę niż Tytell i współprac. (17) oraz Field i współprac. (6). Podając 5 µg do RNA faga f₂ myszkom dożylnie uzyskano 80% przeżywalności myszy zakażonych EMC. Przy podskórnym podaniu tego preparatu stosowano 10-krotnie większą dawkę, otrzymano również 80% przeżywalności myszy. Kleinschmidt i współ-

prac. (10), L a m p s o n i współprac. (14) stosowali jeszcze wyższe dawki indukujące kwasów nukleinowych, uzyskując bardzo wysoki poziom ochrony myszy w stosunku do grupy kontrolnej.

F u c h s b e r g e r i współprac. (8) przebadali wpływ RNA f_2 w różnych dawkach na liniach tkankowych: komórkach ludzkich, mysich L, FZK, otrzewnowych leukocytach mysich, stwierdzając stymulację interferonu jedynie w otrzewnowych leukocytach mysich. W zależności od rodzaju tkanki, jak wykazali K a w a d e i współprac. (9) RNA fagowe (RNA-MS2) może wykazywać dwojakiego rodzaju działanie, bądź jako induktor, bądź jako czynnik hamujący produkcję interferonu.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że pod wpływem badanych kwasów nukleinowych, zarówno w hodowli pierwotnej, jak i Dtr-6, interferon jest produkowany. Intensywność produkcji interferonu zależy od dawki induktora i czasu jego działania. W przypadku RNA-KZM i RNA-WMT II na FZK najintensywniejszą ochronę stwierdzono po 6 godz. inkubacji, stosując dawkę 10 $\mu\text{g/ml}$.

W hodowli komórek Dtr-6 najlepszą ochronę pod wpływem obu kwasów rybonukleinowych stwierdzono po 12 godz. inkubacji, ale dawki tych kwasów, dające najlepszą ochronę tkanki, były różne. Ten sam poziom interferencji uzyskiwano stosując 25 $\mu\text{g/RNA-WMT/ml}$ i 50 $\mu\text{g RNA-KZM/ml}$.

Zastosowanie rybonukleazy trzustkowej, działającej inaktywująco na jednoniciowe RNA (16) spowodowało u obu przebadanych RNA utratę aktywności interferencyjnej.

Przyjmuje się, że podstawą indukcji interferonu przez kwasy nukleinowe jest ich dwuniciowość. Jednakże istnieje sporo prac wykazujących również efektywność jednoniciowych pasm RNA (1, 2, 7, 15, 18). Takie jednoniciowe RNA jest bardziej wrażliwe na rybonukleazę i dlatego, być może, nie zawsze jest możliwe wykazanie ich zdolności interferonogennych. Przedstawione wyniki badań znajdują potwierdzenie w badaniach D e C l e r c q a i współprac. (3), którzy stwierdzają, że badanie indukcji interferonu przez jednoniciowe RNA jest zależne od zastosowania 10^4 razy większej dawki niż wymagane to jest dla struktur dwuniciowych.

Zastosowane w tej pracy dawki RNA wirusa kleszczowego zapalenia mózgu i wirusa mozaiki tytoniu są bardzo wysokie w porównaniu ze stosowanymi przez T y t e l l a i współprac. (17), L a m p s o n a i współprac. (14), F i e l d a i współprac. (6), D o s k o c i l a i współprac. (5), F u c h s b e r g e r a i współprac. (8) dawkami dwuniciowego RNA podawanego zwierzętom doświadczalnym.

Chociaż większość badań wskazuje na efektywność dwuniciowej struktury, to jednak niewiele jest wyników z dwuniciowymi DNA, które ze

względu na dwuniciowość, powinny być efektywnymi komponentami interferonogennymi.

Nie udało się tego wykazać Kleinschmidtowi i współprac. (11), którzy próbowali zastosować DNA faga T4 jako induktora interferonu. De Clercq i współprac. (4) w badaniach z syntetycznymi kwasami dezoksyrybonukleinowymi poli dD:dC, poli dA:dT, poli sAT:AT i DNA faga tylko przy wysokich koncentracjach (4—40 $\mu\text{g/ml}$) wykazali przeciw-wirusową aktywność.

PIŚMIENNICTWO

1. Banks G., Buck K. W., Chain E. B., Himmelweit F., Marks J. E., Tyler J. M., Hollings M., Last F., Stone O.: Viruses in Fungi and Interferon Stimulation.. *Nature* **218**, 542—545 (1968).
2. Borecky L., Lackovic V., Fuchsberger N.: Comparison on Interferon Production in Mouse Leucocytes by Statolon and Complexed Polyribonucleotide Poly I:C. *Acta Virol.* **14**, 329—336 (1970).
3. De Clercq E., Merigan T. C.: Requirement of Stable Secondary Structure for the Antiviral Activity of Polynucleotides. *Nature* **222**, 1148—1152 (1969).
4. De Clercq E., Eckstein F., Merigan T. C.: Structural Requirements for Synthetic Polyanions to Act as Interferon Inducers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **173**, 444—461 (1970).
5. Daskocil J., Fuchsberger N., Vetrak J., Lackovic V., Borecky L.: Double-Stranded f_2 Phage RNA as Interferon Inducer. *Acta Virol.* **15**, 523 (1971).
6. 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 MS2—RF—RNA from *E. coli* Infected with MS2 Coliphage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **58**, 2102—2108 (1967).
7. 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).
8. Fuchsberger N., Vetrak J., Lackovic V., Borecky L., Daskocil J.: Evaluation of the Czechoslovak Double-Stranded RNA Preparation as Inducer of Interferon in Model Experiments. *Acta Cirol.* **16**, 466—476 (1972).
9. Kawade Y., Matsuyama M., Yamamoto Y., Ozeki 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., 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).
11. Kleinschmidt W. J., Dothart R. J., Murphy E. B.: Interferon Production by T-4 Coliphage. *Nature* **228**, 27—30 (1970).
12. Kruczek-Juszczak Z., Kawecki Z.: Indukcja interferencji przez wirusowe kwasy nukleinowe w fibroblastach zarodka kury. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **33**, 1—8 (1978).

13. Kruczek-Juszczak Z., Kawecki Z., Łokaj I.: Indukcja interferencji przez wirusowe kwasy nukleinowe w komórkach Detroit-6. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **33**, 9—14 (1978).
14. 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).
15. Matsuyama H., 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).
16. Petryniak J.: Zastosowanie nukleaz do badania struktury i biologicznej aktywności RNA i DNA. *Post. Biochem.* **18**, 391—418 (1972).
17. Tytell A. A., Lampson G. P., Field A. K., Hilleman M. R.: Inducers of Interferon and Host Resistance III. Double-Stranded RNA from Reovirus Type 3 Virions (Reo 3 RNA). *Proc. Nat. Acad. Sci.* **58**, 1719—1722 (1967).
18. Ujihara M., Kawade Y., Ozeki 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

Представлены результаты исследований явления интерференции, проводимых на двух тканях: протопатической (фибробласт зародыша курицы) и сплошной (человеческого происхождения Detroit-6). В качестве индикаторов применялись рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые кислоты, выделенные из патогенных вирусов для людей и животных, патогенного вируса для растений и из бактериофага. Рибонуклеиновые кислоты проявили наилучшую индукцию интерференции на фибробластах зародыша курицы при применении дозы 10 $\mu\text{g/ml}$ после 6 часов индукции.

SUMMARY

The results of the studies on interference in two tissues: primary (chicken embryo fibroblasts) and continuous (Detroit-6 of human origin) have been presented. As inductors, ribonucleic and deoxyribonucleic acids from viruses pathogenic for humans and animals, from a virus pathogenic for plants, and from a bacteriophage were used. The ribonucleic acids examined showed the best interference induction in fibroblasts of the chicken embryo with a dose of 10 $\mu\text{g/ml}$ after 6 hr induction.

