

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIII, 3

SECTIO C

1978

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zofia KRUCZEK-JUSZCZYK, Zbigniew KAWECKI,
Irena ŁOKAJ

Interferony indukowane przez wirusowe kwasy nukleinowe *in vitro*

Интерфероны, индуцированные вирусными нуклеиновыми кислотами *in vitro*

Interferons Induced by Viral Nucleic Acids *in vitro*

Wiele technik zagęszczania i oczyszczania białka zostało wykorzystanych do oczyszczenia i zagęszczenia interferonu (1, 5, 10). Jednakże żadna z zastosowanych metod nie doprowadziła do całkowitego oczyszczenia i co najważniejsze do podniesienia aktywności biologicznej interferonu.

Na podstawie doświadczeń stwierdzono, że kwasy nukleinowe wirusów zwierzęcych, roślinnych i fagowych indukują interferencję w komórkach pierwotnych i w linii komórkowej Dtr-6 (7, 8).

Interferencję wywołuje białko interferowane, co zostało sprawdzone doświadczalnie.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy wirusowe, bakteryjne, rośliny, zwierzęta doświadczalne i hodowle tkankowe, metody izolacji kwasów nukleinowych oraz oznaczenia kwasów nukleinowych stosowano takie, jak we wcześniejszej pracy (7).

Otrzymywanie interferonu. Do produkcji interferonu stosowano jednowarstwowe hodowle komórek Detroit-6 i fibroblastów zarodka kury w butlach Roux. Hodowle te zakażano optymalną dawką badanego kwasu nukleinowego (7, 8) i inkubowano w temp. 37°C. Następnie hodowlę zamrażano w temp. -20°C. Po rozbiciu tkanki dodawano 1M octan cynku w ilości 1 ml na 100 ml płynu zawierającego interferon. Następnie wirowano przy 3000 obr./min. Odwirowany osad rozpuszczano w 0,2M HCl pH 2,5. Otrzymany koncentrat dializowano w płynie fizjologicznym, doprowadzając pH koncentratu do 6,5. Dalej dializowano w 0,1M buforze

fosforanowym o pH 6. Po dializie preparat zadawano antybiotykami — (100 jedn./ml penicyliny i 100 jedn./ml streptomycyny).

Badanie aktywności interferonu. Aktywność biologiczną interferonu badano na tkance homologicznej i heterologicznej oraz określano jego właściwości poddając działaniu: temp. $56^{\circ}C$ przez 30 min., $20 \mu g/ml$ trypsyny przez 30 min. w $37^{\circ}C$ i pH 2 przez 24 godz. (6).

Obliczanie jednostek interferonowych. Za jednostkę interferonową przyjmowano najwyższe rozcieńczenie interferonu, które dawało 50% zahamowania lysin w porównaniu z kontrolami zakażonymi tą samą dawką wirusa.

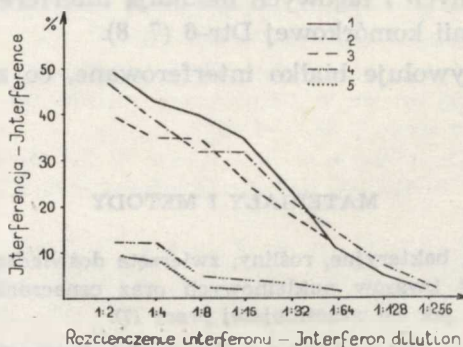
WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

PREPARATY INTERFERONOWE UZYSKIWANE W FIBROBLASTACH ZARODKA KURY

Początkowo próbowano działać preparatem nie zagęszczonym na tkankę homologiczną, jednak po uzyskaniu wyników ochronnych stwierdzono, że istnieje potrzeba zagęszczania badanego preparatu (ryc. 1).

Nie oczyszczony i nie zagęszczony interferon, indukowany przez RNA-WMT II na FZK, posiadał bardzo niską aktywność, nie dającą nawet 50% ochrony tkanki homologicznej. Ta niska aktywność preparatu natywnego spowodowała zastosowanie do wszystkich innych badanych interferonów techniki precypitacyjnej zagęszczającej i częściowo oczyszczającej od materiału balastowego.

Preparat interferonowy zagęszczony, uzyskany pod wpływem RNA-WMT II, posiadał już o wiele wyższą aktywność aniżeli preparat



Ryc. 1. Aktywność interferonu nie oczyszczonego, indukowanego przez RNA—WMT II na FZK; 1 — na tkance homologicznej, 2 — na tkance heterologicznej, 3 — pod wpływem działania temperatury, 4 — pod wpływem działania pH 2, 5 — pod wpływem działania trypsyny

Activity of non-purified interferon induced by RNA of Tobacco Mosaic Virus (TMV) on FZK; 1 — on homologous tissue, 2 — heterogeneous tissue, 3 — Incubated at $56^{\circ}C$, 4 — exposed to a pH of 2, 5 — treated with trypsin

natywny (ryc. 1 i ryc. 2c). W rozcieńczeniu 1 : 8 stwierdzono 82% interferencji. Ta wysoka aktywność utrzymywała się jeszcze przy rozcieńczeniu preparatu w stosunku 1 : 128.

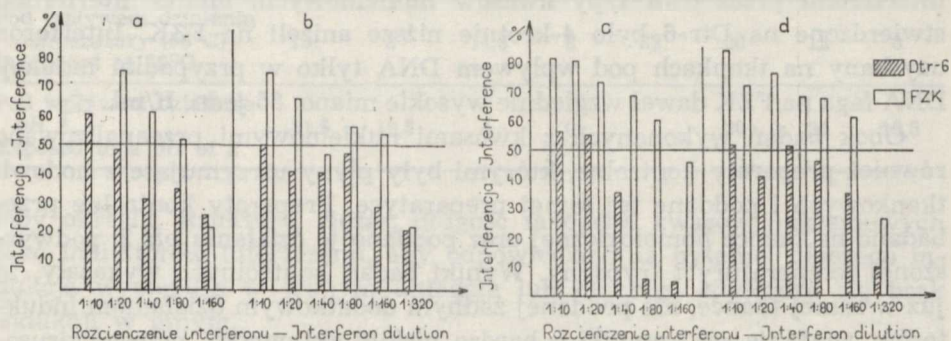
Interferon otrzymany z FZK pod wpływem RNA-KZM był również aktywny, jak i preparat uzyskany pod wpływem RNA-WMT II. W rozcieńczeniu 1 : 8 aktywność tego preparatu dawała 84,5% ochrony tkanki, a przy rozcieńczeniu 1 : 160 stwierdzono jeszcze 61% ochrony (ryc. 2d).

Preparat interferonowy uzyskany pod wpływem DNA 4AL₇/L₈ na FZK wykazywał bardzo wysoki procent (76,5%) interferencji w rozcieńczeniu 1 : 20. Ta wysoka aktywność, dająca ponad 50% ochrony, utrzymywała się aż do rozcieńczenia 1 : 80 (ryc. 2ab).

Preparat interferonowy uzyskany pod wpływem DNA wirusa krowianki na FZK również wykazywał wysoką aktywność ochronną na tkance homologicznej (ryc. 2b). W rozcieńczeniu 1:10 stwierdzono 74% ochrony tkanki. Taką samą aktywność powodowało zastosowanie interferonu otrzymanego po indukcji DNA 4AL₇/L₈ w rozcieńczeniu 1:20.

PREPARATY INTERFERONOWE UZYSKANE W KOMÓRKACH DETROIT-6

Interferon uzyskany pod wpływem DNA faga 4AL₇/L₈ nie wykazywał wysokiej zdolności ochronnej nawet na tkance homologicznej. W rozcieńczeniu 1 : 10 chronił tkankę w 60%, a w rozcieńczeniu 1 : 20 aktywność spadała poniżej 50% (ryc. 2a). Jeszcze niższą aktywność stwierdzono w przypadku interferonu uzyskanego pod wpływem DNA-vacc II. Aktywność tego interferonu nie przekraczała ochrony 50% komórek (ryc. 2b).



Ryc. 2. Aktywność preparatów interferonowych na tkankach homologicznych uzyskanych pod wpływem a — DNA 4AL₇/L₈, b — DNA-vacc II, c — RNA-WMT II, d — RNA-KZM

Activity of interferon preparations on homological tissues obtained under the influence of: a — DNA AL₇/L₈, b — DNA-of Vaccinia virus II, c — RNA-TMW II, d — RNA of Tick-borne, Encephalitis virus

Również preparaty interferonowe uzyskane pod wpływem obu RNA-WMT II i RNA-KZM nie wykazywały szczególnej aktywności. W rozcieńczeniu 1:10 chroniły ponad 50% komórek tkanki (ryc. 2c, d).

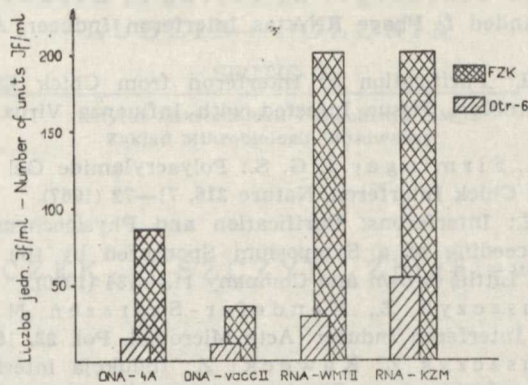
Wszystkie przebadane interferony mimo różnej aktywności wykazywały działanie ochronne w stosunku do tkanki homologicznej i minimalne działanie ochronne w stosunku do tkanki heterologicznej.

Właściwości fizykochemiczne i biologiczne interferonu zostały opisane przez F a n t e s a (3, 4, 5). Wiele prób przeprowadzono w celu uzyskania białka interferonowego o jak najwyższej aktywności. Jednakże żadna ze stosowanych metod nie doprowadziła do całkowitego oczyszczenia i uzyskania aktywnego interferonu. Mimo tych trudności dla interferonów niekompletnie oczyszczonych ustalono już pewne kryteria rozpoznawcze, stanowiące punkt odniesienia w dalszych badaniach. To przeciwwirusowe białko wykazuje specyficzność tkankową, co udało się potwierdzić z całą pewnością w przedstawionych badaniach interferonu produkowanego na FZK. Białko interferonowe nie przechodzi przez błony dializacyjne, jest stałe w szerokim zakresie pH 2—10 i wykazuje stabilność przy ogrzewaniu do temp. $56^{\circ}C/30$ min., dopiero w $85^{\circ}C$ traci swą aktywność.

Wyżej wymienione kryteria zostały określone w stosunku do interferonów. Wszystkie przebadane substancje posiadały cechy białka interferonowego. Przy indukcji interferonu na FZK kwasami RNA uzyskiwano bardzo wysokie miano interferonu (200 jedn. If/ml) — ryc. 3. Podobnie wysokie miano interferonu indukowanego u królików przez Reo-3 otrzymał T y t e l l i współprac. (11) 128—250 jedn. If/ml i D o s k o c i l i współprac. (2) na mysich leukocytach 64—256 jedn. If/ml. W hodowli komórek Dtr-6 nie udało się stwierdzić wyraźnych różnic w indukcji interferonu przez dwa typy kwasów nukleinowych. Miano interferonu stwierdzone na Dtr-6 było 4-krotnie niższe aniżeli na FZK. Interferon uzyskany na tkankach pod wpływem DNA tylko w przypadku indukcji DNA faga na FZK dawał względnie wysokie miano: 85 jedn. If/ml.

Obok badań wykonanych z kwasami nukleinowymi przeanalizowano również preparaty kontrolne, którymi były płyny utrzymujące z hodowli tkankowych i poddane tej samej preparatyce. Preparaty kontrolne przebadano na tkance homologicznej oraz poddano je działaniu pH 2, podwyższonej temperatury i trypsyny. Wyniki badań kontrolnych wykazały, że już w samej tkance, nie poddanej żadnym dodatkowym działaniom induktorów, znajdują się czynniki o bardzo niskiej aktywności przeciwwirusowej (tab. 1). Wyniki te są potwierdzeniem wcześniejszych doniesień (9) o spontanicznym pojawieniu się w zawiesinach komórkowych interferonu o niskiej aktywności.

Nie zostało jeszcze wyjaśnione, dlaczego w niektórych systemach komórkowych kwasy nukleinowe indukują małe ilości interferonu. Należa-



Ryc. 3. Aktywność preparatów interferonowych
Activity of interferon preparations

Tab. 1. Hodowle komórkowe FZK i Dtr-6 jako kontrole zawartości białka posiadające aktywność interferonu
Protein content in tissue cultures of Dtr-6 and Chicken Embryo Fibroblast (FZK) was used as controls in regards to interferon activity

Tkanka Tissue	FZK				Dtr-6			
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	1:20	1:40	1:80
Rozcieńczenie Dilution	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	1:20	1:40	1:80
Tkanka homologiczna Homological tissue	39	32	18	0	33	29	12	12
Tkanka pod wpływem działania trypsyny Treated with trypsin	10,5	11	0	0	28	20	18	0
Pod wpływem działania temperatury (56°C) Incubated at 56°C	18	8	14,5	3	32	20	12	0
Pod wpływem działania pH 2 Exposed to a pH of 2	21,5	19,5	4	0		20	24	10,5

łoby określić strukturę, ciężar, długość łańcucha kwasów nukleinowych jako induktorów interferonu, aby odpowiedzieć na pytanie: dlaczego indukcja występuje w jednym układzie lub dlaczego stwierdza się brak indukcji w innym.

PIŚMIENICTWO

1. Czerczes Z., Wilner L., Solowiow E., Pokidowa N.: Połączenie wysokooczyszczonych preparatów interferonu z kultury клеток kurinych. Antibiotiki 12, 1088—1093 (1967).

2. Doskocil J., Fuchsberger N., Vetrak J., Lackovic V., Borecky L.: Double-Stranded f_2 Phage RNA as Interferon Inducer. *Acta Virol.* **15**, 523 (1971).
3. Fantes K. H.: Purification of Interferon from Chick Embryonic Alantoic Fluids and Fibroblast Tissue Infected with Influenza Virus. *J. Gen. Virol.* **1**, 257—267 (1967).
4. Fantes K. H., Firminger J. G. S.: Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Highly Purified Chick Interferon. *Nature* **216**, 71—72 (1967).
5. Fantes K. H.: Interferons: Purification and Physicochemical Aspects. [w:] *Interferon. Proceeding of a Symposium Sponsored by the New York Heart Association.* Ed. Little, Brown and Company 113—134 (1970).
6. Kruczek-Juszczuk Z., Kandefer-Szerszeń M., Kawecki Z.: Phage DNA as Interferon Inducer. *Acta Microbiol. Pol.* **22**, 169—173 (1973).
7. Kruczek-Juszczuk Z., Kawecki Z.: Indukcja interferencji przez wirusowe kwasy nukleinowe w fibroblastach zarodka kury. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* **33** 1—8 (1978).
8. Kruczek-Juszczuk 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).
9. Lackovic V., Borecky L.: Release of an Interferon — Like Virus Inhibitor During Contact of Mouse Leukocytes with Target Cells. *Acta Virol.* **14**, 178 (1970).
10. Merigan T. C., Winget C. A., Dixon C. B.: Purification and Characterization of Vertebrate Interferons. *J. Mol. Biol.* **13**, 679—691 (1965).
11. 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).

РЕЗЮМЕ

Доказана высокая активность интерфероновых препаратов, полученных на первичной ткани фибробластов зародыша курицы под влиянием вирусных рибонуклеиновых кислот. Титры этих препаратов составляли 200 ед. If/ml. Отмечается почти 80% защиты гомологической ткани этими препаратами, а также их чувствительность к трипсину и нечувствительность к темп. 56°C и pH 2.

SUMMARY

A high activity of the interferon (If) preparations obtained on primary tissue of chicken embryo fibroblasts was shown under the influence of viral ribonucleic acids. The titers of these preparations were 200 units of If/ml. The infection of the homologous tissue was inhibited in over 80% of the cases by these preparations. If preparations were sensitive to trypsin and insensitive to temperature of 56°C and a pH of 2.