

Laboratorul de virologie din Tg. Mureș (cond.: prof. V. Vencdég)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL ACIZILOR NUCLEICI VIRALI

I. Acid ribonucleic infecțios din virusul-Coxsackie

V. Blazsek

Între 1956—1959, *Spirin* (5. 6. 25), *Belozerski* (1), *Gavrilova* (2), *Gierer* (3), și *Fraenkel-Conrat* (4) au izolat din virusul mozaicului de tutun acid ribonucleic (prescurtat: ARN) infecțios, manifestînd activitate biologică și polimerizare în grad mare. După aceste comunicări care au stîrnit o deosebită surpriză, s-a reușit să se izoleze ARN infecțios și din alte virusuri vegetale și animale (26, 27, 28). Cercetările întreprinse pînă acum au dat rezultate pozitive mai cu seamă în cazul virusurilor mici (cu mărimea de aproximativ 20 milimicroni) ca virusul mozaicului de tutun, poliomielitice, encefalitic, al febrei aftoase. Rezultate considerabile au obținut *Portocală* și colaboratorii (7—13) care au izolat ARN infecțios și din virusul gripal A₁ (cu o mărime de aprox. 100 milimicroni).

Aceste rezultate au o importanță foarte mare pentru studiul structurii, înmulțirii și al mecanismului imunității antivirotice. Sînt de așteptat rezultate valoroase și în domeniul sintezei proteinice ca și în acela al cercetărilor oncologice și genetice, întrucît se pare că metoda aplicată nu alterează activitatea biologică a ARN. Controlul procedeele de izolare a ARN utilizat pînă acum a fost posibil numai cu ajutorul metodelor fizico-chimice, fapt care nu a asigurat controlul activității biologice. Rezultatele obținute în legătură cu izolarea din virus a ARN sînt utilizabile și în domeniul studierii acidului nucleic, deoarece în felul acesta se poate controla dacă procedeul aplicat lasă intactă activitatea biologică a ARN. Pînă acum denaturarea proteinelor virale s-a realizat cu ajutorul a două metode principale cu dodecilsulfatul de Na și fenol. Utilizarea fenolului s-a dovedit a fi mai eficace. Cercetările electronmicroscopice (14) arată că în preparatul cu dodecilsulfat se pot pune întotdeauna în evidență particule virale intacte, în timp ce în preparatul cu fenol acest lucru nu e posibil. Procedeul cu fenol este mai rapid și proteina denaturată se poate îndepărta chiar și cu o centrifugare de turaj mică.

Metodele de preparare relatate în literatură diferă unele de altele. Nu rezultă precis ce condiții influențează infecțiozitatea produselor astfel obținute. Datele puțin numeroase în această problemă sînt deseori contradictorii. Pușini cercetători au studiat factorii care influențează stabilitatea moleculei ARN din soluție. Pentru stabilirea condițiilor optime de preparare a ARN viral, cu cea mai mare infecțiozitate, sînt necesare cercetări sistematice, deoarece cu ajutorul procedeele amintite s-a obținut un produs cu o activitate foarte redusă. Datele cercetătorilor întreprinse în acest domeniu sînt valabile și cu privire la ARN de altă origine.

În studiul de față ne ocupăm de prepararea ARN infecțios din virusul Coxsackie și de factorii care influențează stabilitatea lui.

Metodă și rezultate. În cursul cercetărilor noastre am utilizat virusul Cocksackie A₁₀. Exprimăm pe această cale mulțumirile noastre dr-ului S. Abraham pentru prețiosul ajutor pe care ni l-a dat. ARN l-am preparat din suspensie infectată de țesut, obținută după metoda lui Cajal (15), într-o soluție tampon cu pH și molaritate corespunzătoare. Posibilitatea infecției bacteriene am exclus-o, adăugând antibiotice. Pentru stabilirea infecțiozității virusului și a ARN viral am folosit șoareci albi nou-născuți, în interval de 8 ore de la naștere. La stabilirea suspensiei virale LD₅₀ am utilizat procedeul lui Reed și Muench (23). Din fiecare diluție am injectat subcutanat 6—8 șoareci cu 0,03 ml. Activitatea ARN am exprimat-o în procentul de letalitate, astfel încât gradul de infecțiozitate a putut fi urmărit printr-o simplă diluție.

Procedeul nostru e următorul: luăm o suspensie de țesut 10% cu un volum egal de soluție apoasă de fenol 90% și 1/10 volume de cloroform pe care le agităm timp de 10 minute. Amestecul obținut astfel îl centrifugăm 10 minute cu 400 xg. Stratul clar de deasupra îl sifonăm, apoi îl agităm de trei ori cu un volum egal de eter fără peroxid. Rezi-duul de eter îl îndepărtăm cu o barbotare de gaz metan purificat. Înainte de inoculare adăugăm antibiotice.

Pentru prepararea ARN infecțios din virusul Cocksackie (prescurtat: Virusul C) am utilizat mai multe soluții tampon. Fosfatul descris în cazul virusului mozaicului de tutun (0,04 M pH 7,0), citratul relatat la encefalita Mengo (0,01 M pH 7,0), fosfatul utilizat (16) la encefalita de căpușe (0,002 M pH 7,2) și fosfatul întrebuițat la iebră altoasă (0,04 M pH 7,2; 1 M NaCl) le-am utilizat cu soluții tampon. Din rezultatele celor 27 de experiențe pe care le-am efectuat reiese că infecțiozitatea preparatelor obținute este redusă și oscilantă. Acest fapt a constituit un indiciu că activitatea ARN viral depinde de forța ionilor din soluția tampon utilizată. Pentru a confirma această presupunere am folosit în experiențele următoare o soluție tampon conținând fosfat cu o forță ionică și un pH diferite. Rezultatele obținute sînt cuprinse în tabelul 1.

Tabelul Nr. 1.

pH	Molaritatea	Letalitatea în %
5,0	0,06	0
6,0	0,06	0
7,0	0,06	0
8,0	0,06	40
5,0	0,1	0
5,0	0,5	0
7,0	0,1	60
7,0	0,5	50
8,0	0,1	20
8,0	0,5	33

Schimbarea concentrației fosfatului între 0,06—0,5 M ca și ajustarea pH-ului între 5,0—8,0 influențează infecțiozitatea ARN viral. Cel mai activ preparat l-am obținut la un pH de 7,0 în prezența unei forțe ionice crescute. Creșterea în continuare a forței ionice am realizat-o adăugînd soluției încă 0,14 M respectiv 1 M sare neutră (NaCl). Rezultatele sînt trecute în tabelul 2.

Din datele tabelului rezultă că forța ionică a mediului influențează în mare măsură infecțiozitatea ARN. Odată cu creșterea concentrației NaCl crește și infecțiozitatea, atîngînd punctul maxim la 1 M. La această concentrație a NaCl extractul poate fi diluat pînă la 10⁻³ fără să-și piardă infecțiozitatea, iar în celelalte cazuri diluarea duce la suprimarea infecțiozității.

Unii autori (17) cred că una din cauzele activității reduse ar fi acțiunea oxidantă a Fe³⁺ eventual prezent. Dar și cu soluția tampon de pirofosfat recomandată pentru înlătu-

Tabelul Nr. 2.

pH	Molaritatea fosfatului	Molaritatea NaCl	Letalitatea în %
5,0	0,06	0,14	14+
5,0	0,1	0,14	33+
5,0	0,06	1,0	60+
5,0	0,1	1,0	37+
7,0	0,06	0,14	33+
7,0	0,1	0,14	57+
7,00	0,06	1,0	100++
7,0	0,1	1,0	100++

+ în diluție nu infectează,
++ pînă la o diluție de 10^{-3} își păstrează infecțiozitatea.

rarea acestuia (0,01 M; 0,02 M complexon III, pH 7,37) s-a obținut doar un ARN cu o activitate diminuată (aprox. 20%). Acest fapt face verosimilă acțiunea oxidantă dăunătoare a Fe^{3+} eventual prezent.

Se presupune de asemenea că ribonucleaza în urma inactivează preparatul. Ținînd seama de datele din literatură, pentru inhibarea efectului enzimatic, am adăugat soluției de tampon înainte de extragere 1 mg/ml heparină respectiv am efectuat omogenizarea direct cu fenol (18, 19). Nici în felul acesta însă nu am reușit să intensificăm considerabil infecțiozitatea, ba dimpotrivă prezența heparinei a suprimat infecțiozitatea (cercetarea cauzei acestui fenomen este în curs).

În general se susține că preparatul de ARN activ se poate obține numai lucrînd la o temperatură în jurul lui $0^{\circ}C$. Experiențele noastre au fost repetate și la $22^{\circ}C$, dar nu am observat nici o deosebire considerabilă în ceea ce privește activitatea ARN viral. Se pare că temperatura scăzută nu este necondiționat necesară la prepararea ARN din virusul Cocksackie.

În cel mai activ preparat obținut de noi nu am găsit cu reactivul orcină decît ARN, iar cu reactivul difenilamină nu am reușit să punem în evidență acidul deoxiribonucleic. Cu ajutorul reacției de microbiuret nu am putut observa nici prezența proteinei, ceea ce înseamnă că ținînd seama de sensibilitatea reacției, proteina se află numai în urme.

Injectînd subcutanat la șoarecii nou-născuți 0,03 ml de extract, am constatat că acesta a provocat simptome identice cu cele ale virusului nativ (în interval de 3—5 zile animalele au paralizat și au murit). La o diluție de 10^{-7} virusul a fost încă transmisibil.

În cele ce urmează rezumăm particularitățile diferite ale preparatului ARN obținut din virusul C și ale virusului nativ. Ribonucleaza pancreatică ($10\mu g/ml$) a suprimat activitatea ARN la $22^{\circ}C$ în interval de 15 minute, dar nu a suprimat activitatea virusului nativ diluat pînă la același grad de infecțiozitate. Un rezultat similar am obținut adăugînd ser de șoareci sănătoși sau albuș de ou. Acest fapt se explică prin acțiunea ribonucleazei. Comportarea preparatului ARN și a virusului nativ diferă și cînd se păstrează la temperatura camerei, primul pierzîndu-și infecțiozitatea după 19 ore (la $22^{\circ}C$), iar al doilea păstrîndu-o și după 14 zile.

Discuții: Rezultatele cercetărilor noastre arată că pH-ul și forța ionică a mediului au un efect considerabil asupra infecțiozității ARN din virusul C. Forța ionică influențează într-o măsură mai mare stabilitatea agentului infecțios, fiind chiar capabilă să prevină într-o anumită măsură și efectul depolimerizant ce apare la un pH mai scăzut. Observațiile noastre sînt confirmate și de rezultatele pe care le-a relatat Ginoza (20), care a observat la ARN preparat din virusul mozaicului de tutun creșterea stabilității moleculare în prezența unei forțe ionice

ridicate. Concentrația mai mare de sare produce o structură mai organizată, deoarece micșorează efectul forțelor electrostatice divergente dintre grupele de fosfat, suprimând posibilitatea descompunerii moleculei ARN (ceea ce atrage după sine suprimarea infecțiozității), sau cel puțin o diminuare. Acest fapt este dovedit și de observația noastră potrivit căreia pH-ul alcalin arată un anumit efect stabilizant (Tabelul nr. 1), în concordanță cu observațiile referitoare la virusul mozaicului de tutun (17).

Un rezultat asemănător au dat și cercetările efectuate cu ultracentrifugare: viteza de sedimentare a ARN de origine nevirică a crescut odată cu creșterea forței ionice (21, 22). Această observație este adevărată și de faptul că (spre deosebire de Fraenkel—Conrat) nici noi nu am putut pune în evidență acțiunea stabilizantă a soluției tampon de pirofosfat cu o forță ionică mică (0,01 M).

Stabilitatea ARN obținut din virusul C este cu mult mai scăzută decât aceea a virusului nativ. Aceasta se poate constata în comportarea ARN față de ribonuclează și căldură. O comportare diferită se observă și în cazul precipitatului cu etanol: în timp ce ARN precipită de mai multe ori fără să-și diminueze infecțiozitatea, activitatea virusului nativ se reduce la o valoare de un milion de ori mai mică. Aceste date arată că în extract nu există particule de virus nativ, fapt care în cazul virusului din mozaicul de tutun a fost dovedit și cu electronmicroscopul (14). În cursul ultracentrifugării la multe alte virusuri se observă scăderea constanței de sedimentare după tratament cu fenol. Din diferența de stabilizare și din celelalte particularități rezultă că o mare parte a proteinei — sau eventual chiar toată cantitatea — poate fi îndepărtată de pe suprafața particulei virale cu ajutorul procedurii descrise. De aceea particula indică mai degrabă proprietățile ARN, decât cele ale nucleoproteinei virale.

Pînă în prezent nu este lămurită cauza diminuării considerabile a activității ARN viral. Printr-o judicioasă alegere a condițiilor de izolare (pH, forță ionică) infecțiozitatea poate fi ridicată pînă la o anumită limită, dar aceasta nu atinge nici pe departe activitatea particulei de nucleoproteidă nativă. ($LD_{50}=10^3$ față de $LD_{50}=10^8$.)

Diminuarea activității nu poate fi atribuită nici efectului ribonucleazei, deoarece în cursul experiențelor amintite, nici acțiunea fermento-inhibitoare a fenolului nu a intensificat activitatea. Această presupunere este susținută și de datele relatate de Kalnitsky și colaboratorii (24), potrivit cărora efectul maxim al ribonucleazei se produce la un pH scăzut (5,0) și o forță ionică mică. În condițiile experiențelor noastre (la un pH de 7,0 și o forță ionică mare), fermentul a prezentat o activitate redusă. În ciuda acestui fapt, ARN viral a arătat o infecțiozitate mult mai mică decât aceea a virusului nativ. Pentru a avea o imagine justă a ARN infecțios, trebuie să acordăm o deosebită atenție studiului urmelor proteinice. Cercetările referitoare la acțiunea de stabilizare a altor factori și la prevenția unnelor proteinice le vom relata într-o lucrare viitoare.

Sosit la redacție: 28 decembrie 1960.

Bibliografie

1. SPIRIN, A. S., BELOZERZKI, A. N.: Naucniia sesia po nukleinovani kislotam rastieni Ufa, (1958. nov. 25—28); 2. GAVRILOVA, L. P., SPIRIN, A. S.: *Biohimija*, 24, 503 (1959); 3. GIERER, A., SCHRAMM, G.: *Nature*, 177, 702 (1956); 4. FRAENKEL—CONRAT, H., SINGER, B., WILLIAMS R. C.: *Biochim. biophys. acta*, 25, 87 (1957); 5. SPIRIN, A. S., GAVRILOVA, L. P., BRESLER, S. E., MOSEVICKI, M. I.: *Biohimia*, 24, 938 (1959); 6. PORTOCALA, R., BOERIU, V., SAMUEL, I.: *Studii și Cerc. Inframicrobiol.* 10, 51 (1959); 7. *Idem*: *Stud. și Cerc. Inframicrobiol.* 11, 41. (1960); 8. *Idem*: *Acta virol. (Praga)* 3, 172 (1959); 9. *Idem*: *Rev. Med. Chir. Iași* 63, 909 (1959); 10. *Idem*: *Vaprosi virusol.* 2, 178 (1960); 11. *Idem*: *C. r. Acad. Sci.* 249, 201 (1959); 12. *Idem*: *C. r. Acad. Sci.* 249, 848. (1959); 13. PORTOCALA, R., DUMITRESCU, S., IONES-

CU N, I., SAMUEL, I., BOERU, V.: Com. Acad. R.P.R. 10, 453 (1960); 14. TAKAHASHI, N. W., KARLER, A., KNIGHT, C. A.: Virology, 6, 637 (1958); 15. CAJAL, N.: Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. București, (1958); 16. SOCOL, F., EIBIKOVA, H., ZEMLA, J.: Acta virol. (Praha) 4, 65 (1960); 17. FRAENKEL-CONRAT, H., SINGER, B.: Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 1717 (1958); 18. JERNE, N. K., MAALIE, O.: Acta path. microbiol. scand. 40, 362 (1957); 19. KIRBY, K. S.: Biochem. J., 64, 405 (1956); 20. GINOZA, W.: IV. Int. Congr. of Biochem, Vienna (1958); 21. COX, R. A., LITTAUER, V. Z.: Nature, 184, 4889 (1959); 22. KAWADE, Y., KITAMURA, T.: Nature, 181, 1511 (1958); 23. SINKOVICS, J.: A viruskutatás alapjai, Akad. Kiadó Bp., (1955); 24. KALNITSKY, G. HUMMEL, J. P., DIRKS, C. J.: Biol. Chem. 234, 1512 (1959); 25. SPIRIN, A. S., GAVRILOVA, L. P., BELOZERSKI, A. N., DAN, 125, 658 (1956); 26. KRIVISKI, A. S.: Uspeti sovr. biol. 45, 286 (1958); 27. TOVARNICKI, V. I., TIHONENKO, T. I.: Uspeti. sovr. biol., 47, 121 (1959).
