

## Caratteristiche di crescita e infezione persistente del virus Toscana in una linea cellulare

LOREDANA NICOLETTI, PAOLA VERANI e MARIA GRAZIA CIUFOLINI

Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Si riportano dati relativi alla replicazione in cellule VERO del virus Toscana, un nuovo arbovirus isolato da flebotomi in Italia e classificato nella famiglia Bunyaviridae, genere Phlebovirus. La resa virale risultava inversamente proporzionale alla molteplicità di infezione usata e sembrava correlata alla presenza nell'inoculo di particelle difettive interferenti. Con passaggi in serie di virus indiluito si è ottenuto l'instaurarsi di infezioni persistenti resistenti alla superinfezione con virus omologo e, anche se solo parzialmente, a quella con virus correlati antigenicamente, ma suscettibili a quella con virus eterologhi. La sensibilità alla temperatura e la produzione di interferone endogeno non sembrano implicati nell'instaurarsi e/o nel mantenimento della persistenza. Le caratteristiche delle cellule persistentemente infettate suggeriscono un ruolo di particelle difettive interferenti.

**Summary (Replication and Persistence of Toscana Virus in a Cell Line).** - Replication in VERO cells of Toscana virus, a new arbovirus isolated from sandflies in Italy and included in the family of the Bunyaviridae, genus Phlebovirus, is described. The highest yield of infectious virus was obtained from the cells infected at the lowest multiplicity of infection. Autointerference seemed to depend upon the presence of defective interfering particles in the viral stock. Persistent infections were established by serial undiluted passage of the virus. Persistently infected cells were resistant to superinfection with homologous virus, partially resistant to challenge with antigenically related viruses and susceptible to infection with heterologous viruses. Temperature sensitivity and interferon production seemed to be not involved in establishment and/or maintenance of persistence. It is suggested that defective interfering particles may be responsible for persistency.

### INTRODUZIONE.

Il virus Toscana (TOS) è un nuovo virus isolato da flebotomi in Italia e classificato su base morfologica e sierologica nel gruppo sierologico « Phlebotomus fever » degli arbovirus [1] per il quale, del tutto recentemente, è stato istituito il genere *Phlebovirus* della famiglia Bunyaviridae. Sono stati riportati pochi dati riguardo alle caratteristiche biologiche dei virus del genere *Phlebovirus*, data la nota difficoltà di disporre di sistemi cellulari sensibili per la maggior parte di essi.

Il virus TOS è uno dei pochi membri di tale genere capace di replicarsi ad alto titolo con produzione di effetto citopatico in molte linee cellulari.

È stato dimostrato, per virus appartenenti ad altre famiglie, che la presenza del genoma segmentato (caratteristico dei virus della famiglia Bunyaviridae) facilita la generazione di particelle difettive interferenti (DI) e che tali particelle possono essere implicate nell'instaurarsi e nel mantenimento di infezioni persistenti da parte di virus normalmente citolitici [2]. Pochi studi e incompleti sono stati eseguiti con virus della famiglia Bunyaviridae per quanto riguarda sia la generazione e caratterizzazione di particelle DI [3] sia la produzione di colture persistentemente infettate (p.i.) [4].

In questo lavoro sono riportati dati relativi alla replicazione del virus TOS ed all'instaurarsi di infezioni persistenti in una linea cellulare di mammifero.

### MATERIALI E METODI.

**Virus, cellule, terreni.** - Il virus TOS è stato usato o come una sospensione al 10% di cervello di topino neonato infetto (TOS-MB) o come virus purificato per placca mediante tre successivi clonaggi in cellule VERO (TOS-3V). Sono state usate linee cellulari di rene di cercopiteco (VERO) e rhesus (LLC-MK-2). Il terreno di crescita era costituito da MEM + 10% di siero fetale di vitello (SVF); quello di mantenimento da MEM + 2% di SVF.

**Titolazioni del virus.** - I campioni diluiti in PBS + 0,5% di gelatina erano inoculati su monostrati di cellule VERO. Dopo l'adsorbimento veniva aggiunto un terreno costituito da MEM senza rosso fenolo, 0,5% di NaHCO<sub>3</sub>, 5% di SVF e 1% di gomma tragacanth (Sigma). Dopo 7 giorni di incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, il terreno veniva allontanato, le cellule lavate due volte con PBS e colorate con una soluzione di cristal violetto all'1,5% in alcool a 20°. I titoli virali venivano calcolati come unità formanti placca (PFU)/ml.

**Curva di crescita.** - Monostrati di cellule VERO in piastre di diametro di 35 mm erano inoculate con virus TOS-MB con molteplicità d'infezione (MOI)

di 1, 0,1 o 0,01 PFU/cellula in 0,2 ml. Dopo 1,30 ore di adsorbimento a 37° C, le cellule venivano lavate due volte con PBS e ad esse erano aggiunti 2 ml di terreno di mantenimento. Due piastrine per ogni MOI erano prelevate a vari intervalli; il terreno veniva raccolto e congelato a -80° C. Le cellule venivano staccate meccanicamente in 2 ml di PBS + 0,5 % di gelatina e congelate a -80° C. I campioni di ogni MOI erano titolati contemporaneamente. Prima della titolazione i campioni contenenti le cellule subivano un ciclo rapido di congelamento-scongelo.

*Passaggi in serie di virus indiluito e instaurarsi di infezioni persistenti.* - Monostrati di cellule VERO erano infettati inizialmente ad alta MOI con virus TOS-3V. Ogni 24 ore una nuova coltura era infettata con 2/3 del terreno del passaggio precedente, ed il restante terreno era congelato a -80° C per eventuali titolazioni.

*Immunofluorescenza.* - È stata usata la tecnica indiretta. Le cellule erano fatte crescere su vetrini Lab-Tek, fissate in acetone freddo e conservate a -80° C fino al momento della colorazione. Venivano usati siero anti-TOS prodotto in coniglio e siero anti-coniglio prodotto in capra e coniugato con fluoresceina (Nordic). Dopo la colorazione i vetrini erano osservati con un microscopio Leitz.

*Superinfezione.* - Monostrati confluenti di cellule p.i. erano superinfettati con 1 PFU/cellula dei virus TOS, Tribec, virus della stomatite vescicolare (VSV), o 0,1 PFU/cellula dei virus Sandfly Fever Naples (SFN) o Sicilian (SFS). I controlli erano costituiti da cellule VERO infettate allo stesso modo e da cellule p.i. non superinfettate. Da 1 a 7 giorni dopo l'infezione, a seconda del virus superinfettante, il supernatante era raccolto e titolato per la presenza dei rispettivi virus.

## RISULTATI E DISCUSSIONE.

*Curva di crescita.* - Nella Tab. 1 sono riportati i risultati relativi alla replicazione del virus TOS in cellule VERO a varie MOI: 1, 0,1 e 0,01 PFU/cellula. L'effetto citopatico risultava evidente 24-48 ore dopo l'infezione con distruzione completa del monostrato cellulare in 3 giorni. Il titolo massimo del virus associato alle cellule si aveva fra le 24 e le 36 ore dopo l'infezione e poi declinava, mentre quello liberato nel terreno raggiungeva il massimo a 60-72 ore. Si è ottenuta la più alta resa virale con la più bassa MOI usata, risultando la resa inversamente proporzionale alla MOI. Questo risultato poteva essere spiegato con la presenza nell'inoculo virale (cervelli di topo infetti) di particelle difettive che interferiscono con la replicazione del virus. Tale presenza è stata messa in evidenza con un saggio di interferenza omologa, eseguito come descritto per il Togavirus Sindbis [5] (dati non presentati).

*Infezioni persistenti.* - Si è voluto quindi saggiare la possibilità di produrre infezioni persistenti in cellule VERO infettate con il virus TOS, eseguendo passaggi in serie di virus indiluito, in condizioni cioè che in generale favoriscono un accumulo di particelle DI [6].

Tabella 1. - Curva di crescita del virus TOS in cellule VERO in funzione della molteplicità d'infezione (MOI).

TEMPO (ore dopo l'infezione)	MOI					
	0,01 PFU/cellula		0,1 PFU/cellula		1 PFU/cellula	
	Cellule (a)	Terreno (b)	Cellule	Terreno	Cellule	Terreno
0	2,41	2,09	3,41	2,98	4,02	3,69
12	5,68	2,69	5,90	3,23	4,95	3,29
24	7,24	4,68	6,77	4,90	5,65	4,60
36	7,63(c)	6,84	6,74	6,63	5,47	5,79
48	7,25	7,57	6,32	7,06	5,20	5,94
60	6,80	7,79	5,96	7,32	4,92	6,25
72	6,82	7,79	6,00	7,57	4,65	5,83

(a) Virus associato alle cellule ( $\log_{10}$  PFU/ml).

(b) Virus rilasciato nel terreno ( $\log_{10}$  PFU/ml).

(c) Livello massimo di virus.

I primi passaggi in serie di virus indiluito provocavano la completa distruzione del monostrato cellulare 3-4 giorni dopo l'infezione. Nei passaggi seguenti alcune cellule sopravvivevano e quindi si moltiplicavano fino a formare monostrati confluenti. Successivamente, ogni 4-5 giorni, venivano eseguiti passaggi delle colture in un rapporto 1:2. Talvolta, al momento della subcoltura, era prelevato il terreno che era poi saggiato per la presenza di virus. Le caratteristiche dell'instaurarsi di una di tali linee (V-A19), ottenuta dopo 19 passaggi indiluiti di virus, sono illustrate nella Fig. 1. I dati riportati riguardano 53 subcolture per un totale di circa 250 giorni di osservazione. Durante tale periodo le colture hanno attraversato stadi di crisi, con esteso effetto citopatico e morte della maggior parte delle cellule. Le poche cellule sopravvissute tuttavia si riproducevano fino a raggiungere di nuovo la confluenza, continuando a liberare virioni infettanti. La quantità di virus rilasciata dalle colture p.i. variava durante il periodo di osservazione.

La presenza di antigeni virali nelle colture p.i. è stata messa in evidenza con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta. La distribuzione della fluorescenza nel citoplasma cellulare non mostrava significative differenze con quella osservata in cellule VERO infettate con il virus TOS (Fig. 2).

Una caratteristica descritta per le colture p.i. è quella di essere resistenti alla superinfezione con virus omologo, ma suscettibili a quella con virus eterologhi [7]. Nella Tab. 2 sono riportati i dati relativi alla superinfezione con il virus omologo e con virus eterologhi delle cellule VERO p.i. con il virus TOS. I risultati mostrano una resistenza alla superinfezione con il virus omologo ed anche con un Phlebovirus strettamente correlato antigenicamente (SFN), una minore resistenza alla superinfezione con un Phlebovirus antigenicamente più distante (SFS) e suscettibilità alla superinfezione con un Orbivirus (Tribec) e con un Rhabdovirus (VSV). Vari gradi di interferenza con la replicazione di virus eterologhi ma correlati antigenicamente sono stati osservati nelle colture p.i. con il virus Dugbe, un altro membro della famiglia Bunyaviridae [4] e in colture p.i. con il virus Tacaribe, un Arenavirus [8]. Tale tipo di

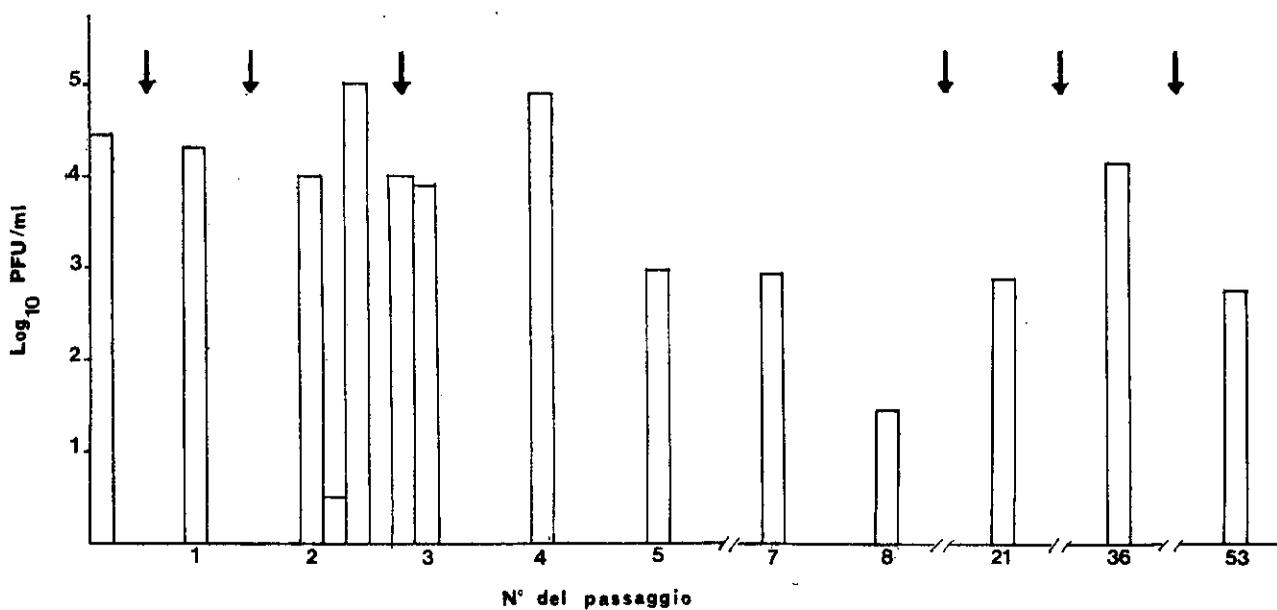


FIG. 1. - Instaurarsi di cellule VERO persistentemente infettate con virus TOS (V-A19). *In ascissa*: numero delle subcolture di V-A19 nel corso di 250 giorni di osservazione. *In ordinata*: titolo del virus rilasciato nel terreno. Le frecce indicano i periodi di crisi con evidente effetto citopatico



FIG. 2. - A) Cellule VERO persistentemente infettate con il virus TOS (7<sup>a</sup> subcoltura) fissate e colorate con anticorpi fluorescenti (metodo indiretto) ( $\times 220$ ). B) Cellule VERO 24 ore dopo l'infezione con il virus TOS preparate come in A ( $\times 220$ )

Tabella 2. - Superinfezione delle colture persistentemente infettate con il virus TOS (5a subcoltura)(a).

VIRUS SUPERINFETTANTE	PFU test (b)	PFU controllo (c)
TOS .....	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
SFN .....	$1,7 \times 10^3$	$6,7 \times 10^5$
SFS .....	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$
Tribec .....	$1,9 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$
VSV .....	$2,9 \times 10^9$	$8,6 \times 10^8$

(a)  $10^9$  PFU/ml di virus infettante erano liberate dalle cellule persistentemente infettate non superinfettate.

(b) Titolo del virus liberato da colture persistentemente infettate superinfettate con i singoli virus.

(c) Titolo del virus liberato da cellule VERO infettate con i singoli virus.

interferenza è simile a quella descritta come una delle caratteristiche biologiche di particelle DI presenti nelle preparazioni di numerosi virus animali [6].

Si è ricercata la presenza di particelle DI in colture p.i. con il virus TOS (subcoltura 53 e 63) mediante un saggio di interferenza con la replicazione di virus purificato (TOS-3V). La presenza di particelle DI non è

stata evidenziata nel terreno di coltura delle cellule p.i. saggiato non concentrato. Non si possono però escludere nel sistema studiato livelli non titolabili di particelle DI, essendo il metodo usato relativamente insensibile. Fra i vari meccanismi ipotizzati come responsabili dell'instaurarsi e del mantenersi di infezioni persistenti da parte di virus normalmente citocidi, oltre alla produzione di particelle DI, la generazione di mutanti temperatura sensibili e la produzione di interferone endogeno sono stati studiati dettagliatamente in differenti sistemi virus-cellula [9].

Sono stati eseguiti esperimenti per dimostrare sia la presenza di mutanti ts nella progenie virale liberata dalle cellule VERO p.i. con il virus TOS, sia la produzione di interferone da parte di esse, anche se la linea cellulare usata dovrebbe escludere il coinvolgimento del sistema interferone, essendo incapace di produrlo [10]. Tali esperimenti hanno dato esito negativo (dati non presentati). Considerando quindi le modalità con cui le linee cellulari p.i. con il virus TOS sono state ottenute ed i risultati delle prove di interferenza omologa ed eterologa, è probabile che particelle virali DI siano implicate nell'instaurarsi e/o nel mantenersi di tali linee e che sia possibile dimostrarne la presenza con metodi di saggio più sensibili.

Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto Finalizzato « Virus »: Contratti n. 80.00652.85 e 81.00250.84.

#### BIBLIOGRAFIA

1. VERANI, P., LOPES, M. C., NICOLETTI, L. & BALDUCCI, M. 1980. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy. I. Isolation and characterization of a Sandfly Fever Naples like virus. *Zbl. Bakt. Suppl.* **9**: 195-201.
2. HUANG, A. S. 1973. Defective-interfering viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **27**: 101-107.
3. KASCKSAK, R. J. & LYONS, M. J. 1978. Bunyamwera virus. II. The generation and nature of Defective-interfering particles. *Virology*. **89**: 539-546.
4. DAVID-WEST, T. S. & PORTERFIELD, J. S. 1974. Dugbe virus, a tick-borne virus from Nigeria. *J. Gen. Virol.* **23**: 297-307.
5. KOWAL, K. J. & STOLLAR, V. 1980. Differential sensitivity of infectious and defective-interfering particles of Sindbis virus to ultraviolet irradiation. *Virology*. **103**: 149-157.
6. HUANG, A. S. & BALTIMORE, D. 1977. Defective interfering animal viruses. In: *Comprehensive Virology*. H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner (Ed.). Plenum, New York. **10**: 73-116.
7. HOLLAND, J. J., KENNEDY, S. I. T., SEMLER, B. L., JONES, C. L., ROUX, L. & GRABAU, E. A. 1980. Defective interfering RNA viruses and the host-cell response. In: *Comprehensive Virology*. H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner (Ed.). Plenum, New York. **16**: 137-192.
8. GIMENEZ, H. B. & COMPANS, R. W. 1980. Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells. *Virology*. **107**: 229-239.
9. FRIEDMAND, R. M. & RAMSEUR, J. M. 1979. Mechanisms of persistent infections by cytopathic viruses in tissue culture. *Arch. Virol.* **60**: 83-103.
10. DESMYTER, J., MELNICK, J. L. & RAWLS, W. E. 1968. Defectiveness of interferon production and of Rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* **2**: 955-961.

## Effetto di alfa interferone sul differenziamento eritroide di una linea di cellule leucemiche umane, K562 (S)

LIVIA CIOÈ (a), PACIFICO MEO (a) e GIOVANNI BATTISTA ROSSI (b)

(a) Istituto di Virologia, Università degli Studi, Roma;

(b) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Le cellule K562(S) possono essere indotte a differenziare lungo la linea eritroide mediante trattamento con acido butirrico ed emina. L'induzione determina la sintesi di emoglobine embrionali e fetali. La somministrazione di basse dosi (100-1.000 UI/ml) di interferone umano leucocitario,  $\alpha$ -IFN, a cellule K562(S) determina un aumento dose-dipendente della sintesi di emoglobina sia in assenza che in presenza degli induttori. Al contrario il trattamento con alte dosi (più di 10.000 UI/ml) determina una inibizione, reversibile e dose-dipendente, del differenziamento eritroide indotto.

**Summary** (Effect of Alpha-interferon on the Erythroid Differentiation of K562(S) Cells, a Human Leukemic Line). - Human leukemia K562(S) cells can be induced to differentiate along the erythroid pathway by bemin or butyric acid. In both cases embryonal as well as fetal hemoglobins are produced. The administration of low doses (100-1.000 UI/ml) of human leucocyte interferon,  $\alpha$ -IFN, to the cells results in a dose-dependent enhancement of erythroid differentiation, either in the presence or in the absence of the inducers. On the contrary, higher doses (above 10.000 UI/ml) inhibit hemoglobin synthesis. The effect is reversible and dose-dependent.

### INTRODUZIONE.

La linea cellulare K562 venne isolata da Lozzio e Lozzio [1] nel 1975 da un paziente affetto da leucemia mieloide cronica, in fase acuta. Queste cellule furono considerate per anni precursori indifferenziati della linea mieloide, ma nel 1979 Andersson e Coll. [2] dimostrarono che esse potevano essere indotte a sintetizzare emoglobina in seguito al trattamento con acido butirrico. Poco dopo, un gruppo di ricercatori inglesi [3] dimostrò che anche l'emina induceva queste cellule lungo la linea eritroide, con sintesi di emoglobine embrionali e fetali, anziché adulte. Cioè e Coll. [4] hanno inoltre dimostrato che un clone della linea cellulare K562, il clone S, può essere indotto al differenziamento eritroide sia con acido butirrico che con emina. È stato anche dimostrato che il trattamento con i due induttori determina un'espressione differenziale dei geni delle globine embrionali e fetali, in quanto le cellule trattate con acido butirrico contengono prevalentemente

emoglobina Gower 1 ( $\epsilon_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\gamma_2\epsilon_2$ ), mentre il trattamento con emina induce prevalentemente emoglobina X ( $\epsilon_2\gamma_2$ ) e Bart ( $\gamma_2$ ) [4]. La linea cellulare K562 può essere, quindi, considerata il corrispettivo umano del sistema murino di Friend [5], in quanto cellule indifferenziate possono essere « indotte » a produrre specifici marcatori eritroidi.

È stato studiato l'effetto di interferone umano (IFN) sul differenziamento del clone S della linea K562, in presenza ed in assenza degli induttori acido butirrico ed emina.

### MATERIALI E METODI.

Le cellule K562(S) vengono coltivate in terreno RPMI addizionato del 10% di siero fetale bovino. Il protocollo per l'induzione della sintesi di emoglobina è il seguente: le cellule, che crescono in sospensione, vengono seminate alla concentrazione di 200.000 cellule/ml in presenza delle concentrazioni degli induttori indicate nel testo. Dopo 4 giorni, le cellule vengono contaminate e colorate con benzidina, secondo il metodo di Orkin e Coll. [6], per determinare il numero delle cellule che contengono emoglobina.

L'interferone, usato negli esperimenti descritti nel testo, è stato ottenuto dal laboratorio del Dr. Cantell, Finlandia; è un interferone umano leucocitario, o alfa, e la sua attività specifica è di  $10^6$  U/mg di proteina. Le dosi vengono espresse come Unità Internazionali.

### RISULTATI.

**Sensibilità ad alfa interferone delle cellule K562 (S).** - Per prima cosa è stata saggiata la sensibilità delle cellule K562 (S) all'azione antivirale di alfa interferone ( $\alpha$ -IFN). La Fig. 1 mostra una curva di inibizione della replicazione del virus della stomatite vescicolare (VSV) in cellule trattate con dosi crescenti di  $\alpha$ -IFN. Sono necessarie 100-1.000 UI/ml di  $\alpha$ -IFN per ridurre di una unità logaritmica il titolo virale. Questo dimostra la scarsa sensibilità delle cellule K562 (S) ad IFN, considerando che sono sufficienti 5-10 UI/ml per ottenere lo stesso effetto sulla replicazione di VSV in un'altra linea cellulare umana, le cellule HeLa.

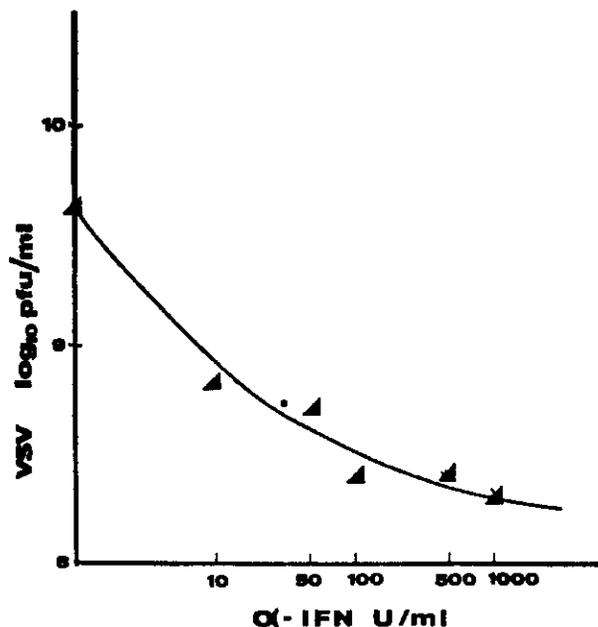


FIG. 1. - Sensibilità delle cellule K562 (S) all'azione antivirale di alfa interferone. Le cellule K562 (S) sono state seminate alla concentrazione di 200.000 cellule/ml in terreno RPMI addizionato del 10 % di siero fetale bovino, in presenza delle concentrazioni di  $\alpha$ -IFN indicate. Dopo 24 ore, le cellule sono state lavate e infettate con 5 PFU/cellula di virus della stomatite vescicolare. Dopo 1 ora a 37 °C, il virus non adsorbito è stato allontanato mediante lavaggi e le cellule sono state riseminate in terreno fresco. Dopo 18 ore, i supernatanti sono stati raccolti e centrifugati per allontanare i detriti cellulari. Il virus presente nei supernatanti è stato titolato con il metodo delle placche su un monostrato di cellule di topo L929

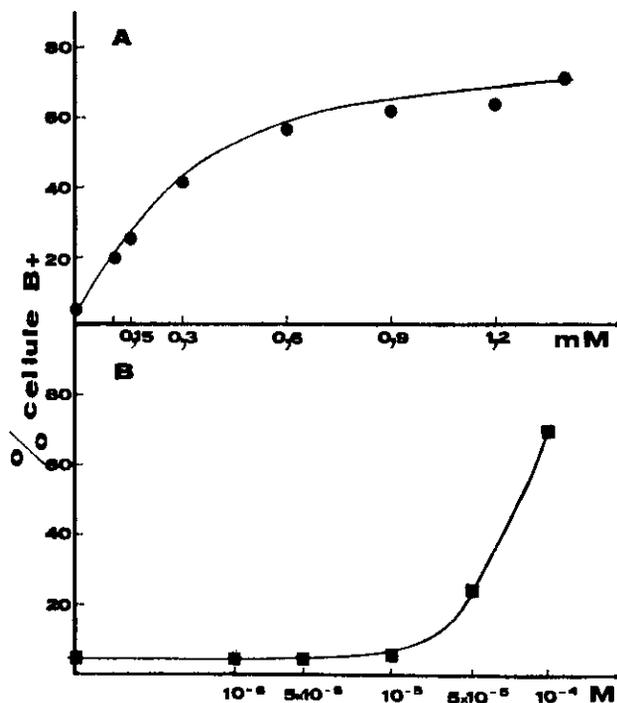


FIG. 2. - Effetto di dosi crescenti di acido butirrico ed emina sul differenziamento eritroide delle cellule K562 (S). Le cellule K562 (S), seminate ad una concentrazione di 200.000 cellule/ml, sono state trattate con le dosi di induttore indicate. Dopo 4 giorni, sono state colorate con benzidina, come descritto in «Materiali e Metodi»

Effetto di alfa interferone sul differenziamento eritroide delle cellule K562 (S). - La Fig. 2 mostra una tipica curva dose-risposta di acido butirrico ed emina sul differenziamento eritroide delle cellule K562 (S). La Tab. 1 mostra l'effetto di dosi crescenti di  $\alpha$ -IFN (da 10.000 a 160.000 UI/ml) sul differenziamento eritroide di cellule K562 (S) indotte con acido butirrico 1,4 mM ed emina 10<sup>-4</sup> M, dosi capaci di indurre, dopo 4 giorni in coltura, più del 60 % di cellule benzidino-positivo (B+) (Fig. 2). Alfa IFN esercita chiaramente un marcato effetto inibitorio sul differenziamento eritroide delle cellule K562 (S). L'effetto è reversibile; infatti, se cellule indotte con emina 10<sup>-4</sup> M e trattate con dosi crescenti di  $\alpha$ -IFN per 4 giorni, vengono lavate estensivamente per allontanare IFN e riseminate in terreno fresco, dopo 24 ore esse sono capaci di differenziare esattamente come cellule di controllo mai venute a contatto con  $\alpha$ -IFN (colonna a destra, Tab. 1). L'effetto inibitorio sul differenziamento è accompagnato da un effetto sulla crescita cellulare, che è ridotta all'incirca del 50 % anche alle massime dosi di  $\alpha$ -IFN usate, in assenza, però, di mortalità. Anche questo effetto di  $\alpha$ -IFN sulla crescita cellulare è reversibile dopo allontanamento di IFN.

Nel corso degli esperimenti sulla inibizione del differenziamento eritroide delle K562 (S) da parte di  $\alpha$ -IFN, alcuni risultati sembravano indicare che dosi di  $\alpha$ -IFN inferiori a 10.000 UI/ml potessero esercitare un effetto stimolante, anziché inibente il differenziamento. Le condizioni sperimentali erano però tali da non rendere significativi i dati, in quanto, per poter osservare un effetto inibitorio, le dosi degli induttori erano ovviamente le ottimali, tali da dare il massimo del differenziamento cellulare.

L'approccio sperimentale per chiarire il problema è stato quello di scegliere dosi subottimali di induttori, capaci cioè di indurre solo parzialmente le cellule. In base alle curve dose-risposta mostrate in Fig. 2, sono state scelte le seguenti concentrazioni di acido butirrico ed emina, 0,15 mM e 5 × 10<sup>-5</sup> M rispettivamente, capaci di indurre solo il 20-25 % delle cellule dopo 4 giorni. In queste condizioni sperimentali, 100-1.000

Tabella 1. - Effetto di alfa-interferone sul differenziamento delle cellule K562 (S) indotte da acido butirrico ed emina: alte dosi.

$\alpha$ -IFN UI/ml	% B+		% B+ dopo 24 ore dalla rimozione $\alpha$ -IFN (a)
	dopo 4 giorni di trattamento con Acido butirrico 1.4 mM	Emina 10 <sup>-4</sup> M	
0	63	71	50
10.000	42	62	67
20.000	n.d.	52	67
40.000	34	53	69
80.000	27	44	70
160.000	15	35	69

(a) % B+ dopo 24 ore dalla rimozione di  $\alpha$ -IFN di cellule trattate con emina 10<sup>-4</sup>M e le dosi indicate di  $\alpha$ -IFN, per 4 giorni.

n.d. = non determinato.

Tabella 2. - Effetto di alfa-interferone sul differenziamento delle cellule K562 (S): basse dosi.

$\alpha$ -IFN UI/ml	% B+ dopo 4 in presenza di		
	—	Acido butirrico 0.15 mM	Emina $5 \times 10^{-4}$ M
0 .....	5,7	17,5	26,0
50 .....	8,0	22,0	32,5
100 .....	7,5	23,0	37,5
500 .....	12,5	41,0	40,0
1.000 .....	11,0	34,0	35,0
5.000 .....	9,0	28,0	27,0

UI/ml di  $\alpha$ -IFN sono capaci di indurre un aumento molto significativo del numero delle cellule B+ (Tab. 2). Da notare che l'effetto stimolante il differenziamento è presente anche in cellule non indotte, anche se ovviamente a livelli molto bassi. Il massimo dell'effetto « inducente » di  $\alpha$ -IFN si ottiene con 500 UI/ml (Tab. 2).

Risultati preliminari indicano che anche beta-IFN, lo IFN fibroblastico, esercita lo stesso effetto bifasico, cioè alte dosi inibiscono e basse dosi stimolano il differenziamento delle cellule K562 (S) (dati non mostrati).

#### CONCLUSIONI.

I dati riportati confermano, in un sistema umano, i risultati ottenuti con IFN nel sistema murino di Friend [4], indicando un effetto regolatorio, forse fisiologico, di IFN sul sistema eritropoietico.

Ci si propone ora di studiare nello stesso sistema anche l'effetto di gamma-IFN, l'IFN immune, il quale ha in comune con l'alfa ed il beta la proprietà antivirale, ma ne differisce sia per caratteristiche fisiche che per proprietà biologiche. Si intende, inoltre, analizzare i tipi di emoglobine stimulate da IFN, per determinare se l'effetto di IFN è di puro incremento di attività di geni già indotti, o se, invece, IFN è capace di attivare nuovi geni globinici, ad esempio i geni per le globine beta, non espressi in queste cellule.

Questo lavoro è stato sovvenzionato, in parte, dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetto Finalizzato « Virus », Contratti nn. 80.00636.84 e 80.01952.84, e Progetto Finalizzato « Controllo della crescita neoplastica », Contratto n. 80.01943.96.

#### BIBLIOGRAFIA

1. LOZZIO, C. B. & LOZZIO, B. B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. **45**: 321-334.
2. ANDERSSON, L. C., JOKINEN, M. & GAHMBERG, C. G. 1979. Induction of erythroid differentiation in a human leukaemia cell line K562. *Nature*. **278**: 364-365.
3. RUTHERFORD, T. R., CLEGG, J. B. & WEATHERALL, D. J. 1979. K562 human leukaemic cells synthesize embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature*. **280**: 164-165.
4. CIOÈ, L., McNAB, A., HUBBELL, H., MEO, P., CURTIS, P. & ROVERA, G. 1981. Differential expression of the globin genes in human leukemia K562(S) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. *Cancer Res.* **41**: 237-243.
5. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PESCHLE, C. & AFFABRIS, E. 1980. Interactions of interferon with *in vitro* model systems involved in hematopoietic cell differentiation. *Ann. New York Acad. Sci. (U.S.A.)*. **350**: 279-293.
6. ORKIN, S. H., HAROSI, F. I. & LEDER, P. 1975. Differentiation of erythroleukemic cells and their somatic hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **72**: 98-102.

## Effetti dell'interferone sui livelli di attività dell'ornitina decarbossilasi nelle cellule di Friend

MARIA ROSARIA CAPOBIANCHI (a), GIOVANNI BATTISTA ROSSI (b) e ANTONINA DOLEI (a)

(a) Istituto di Virologia, Università degli Studi, Roma;

(b) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Gli effetti dell'interferone sul differenziamento eritroide delle cellule leucemiche murine di Friend (FLC) sono stimolatori a basse dosi ed inibitori ad alte dosi, mentre l'espressione del virus integrato è sempre inibita. L'ornitina decarbossilasi (ODC), enzima chiave nella sintesi delle poliammine, può avere un ruolo importante nell'induzione del differenziamento da parte del DMSO. Abbiamo saggiato l'attività ODC in FLC trattate con IFN in presenza ed in assenza di DMSO. E' stata trovata correlazione tra gli effetti di IFN sul differenziamento e attività ODC, in quanto alte dosi inibiscono e basse dosi stimolano questa attività enzimatica.

**Summary** (Interferon-induced Modulation of Ornithine Decarboxylase Activity in Friend Cells). - Interferon (IFN) effects on the erythroid differentiation of Friend leukemia cells are stimulatory or inhibitory according to the doses (low and high, respectively) used. Ornithine decarboxylase, a crucial enzyme in the polyamine pathway, may play a role in the DMSO-induced FLC differentiation. ODC activity has been tested in IFN-treated FLC in the presence and in the absence of DMSO. A correlation has been found between IFN effects on FLC differentiation and ODC activity: in fact high doses inhibit and low doses stimulate this enzyme activity.

### INTRODUZIONE.

Le cellule eritroleucemiche di Friend (FLC) sono proeritroblasti murini cronicamente infetti con il complesso virale di Friend (FLV). La maggior parte dei cloni disponibili di FLC hanno un livello di differenziamento spontaneo molto basso (0,5-2%), ma sono in grado di differenziare fino all'80-90% in seguito al trattamento con una serie di composti, tra cui il dimetil-solfossido (DMSO); per una rassegna vedi [1]. Gli studi sugli effetti dell'interferone (IFN) sulle FLC hanno mostrato che esso esercita un'azione modulatrice bifasica nei riguardi del differenziamento indotto dal DMSO; infatti basse dosi di IFN (fino a 300 U/ml) sono in grado di elevare la percentuale di cellule differenziate, mentre dosi di IFN superiori a 1.000 U/ml (alte dosi) risultano inibitorie.

Dati già pubblicati [2-4] indicano che tale effetto è accompagnato da aumento dell'accumulo di mRNA specifico per la globina nel caso delle basse dosi di IFN, e da riduzione di tale accumulo nel caso delle alte dosi. Tuttavia in questo caso l'effetto sulla trascrizione è accompagnato da un effetto sulla traduzione, perché la pur ridotta quantità di mRNA per la globina che si trova nelle FLC trattate con alte dosi di IFN non è tradotta.

Gli studi per determinare quale sia il bersaglio primario dell'azione dell'IFN sul differenziamento delle FLC sono stati condotti in diverse direzioni: da una parte studi sugli eventi iniziali dell'interazione DMSO-cellula che stabiliscono il progredire verso il differenziamento; dall'altra isolamento e caratterizzazione di varianti cellulari resistenti all'IFN; infine studi sull'espressione di marcatori precoci collegati in maniera più o meno diretta con il differenziamento.

L'ornitina decarbossilasi (ODC) è l'enzima chiave che catalizza la prima reazione nella sintesi delle poliammine, un gruppo di composti cationici coinvolti nella crescita cellulare e probabilmente nei processi differenziali. Il livello di questo enzima si innalza rapidamente nella cellula in seguito ad una varietà di stimoli, come aggiunta di siero, ormoni, fattori di crescita e, nelle cellule di Friend in particolare, in seguito al trattamento con alcuni induttori del differenziamento eritroide, tra cui il DMSO [5, 6]. In uno studio condotto in collaborazione con il Dr Y. Gazitt, Hadassah Medical School, Gerusalemme, abbiamo esaminato i livelli di attività ODC in cellule di Friend trattate con varie dosi di IFN.

### MATERIALI E METODI.

**Cellule.** - In questo studio è stato usato il clone 745A. In un esperimento tipo le cellule sono seminate ad una concentrazione di  $10^6$ /ml in terreno addizionato del 10% di siero bovino fetale. Dopo 24 ore le cellule, in attiva crescita logaritmica, sono contate e riseminate a  $10^6$ /ml nelle varie condizioni sperimentali ( $\pm$  DMSO,  $\pm$  IFN). A vari tempi dopo la semina (3, 6 e 9 ore) vengono prelevate aliquote di  $2-3 \times 10^6$  cellule, centrifugate, lavate tre volte con PBS e lisate in tampone

ipotonico. Il lisato cellulare viene centrifugato a 200 g a freddo e il supernatante viene saggiato per attività ODC. Colture parallele di ogni condizione vengono incubate per 3 giorni a 37° C per controllare, mediante colorazione con benzidina, il livello di differenziamento raggiunto.

**Saggio di attività ODC.** - L'attività ODC viene misurata usando L-(<sup>14</sup>C)ornitina come substrato. 100 µl di estratto cellulare sono incubati in un volume finale di 250 µl per un'ora a 37° C con il substrato marcato. La reazione viene fermata con 50 µl di acido tricloroacetico al 50 % freddo. La <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberata viene fatta intrappolare per 16 ore nell'idrossido di Hyamina, dopo di che si aggiunge il liquido di scintillazione e si conta allo scintillatore. In queste condizioni di reazione, il saggio enzimatico è lineare sia con il tempo che con la quantità di estratto cellulare. Una unità di enzima è la quantità capace di sviluppare una micromole di CO<sub>2</sub> per ora in queste condizioni. I risultati sono una media di almeno 2 esperimenti fatti in duplicato; a sua volta il saggio viene condotto in doppio per ogni campione, e la variabilità tra i duplicati è inferiore al 10 %. Al tempo zero in genere il livello di attività enzimatica nelle cellule è 2-4 milliunità/10<sup>6</sup> cellule.

**Interferone.** - Interferone murino è preparato su cellule L mediante induzione con il virus della malattia di Newcastle. Per una più dettagliata descrizione delle metodiche di produzione e purificazione di IFN si rimanda a [2]. L'interferone usato negli esperimenti ha un'attività specifica di circa 10<sup>6</sup> U/mg di proteine.

#### RISULTATI.

La Fig. 1 mostra l'attività ODC nelle FLC in un intervallo di tempo di 9 ore a partire dall'aggiunta dell'induttore (1,5 % DMSO) in presenza o in assenza di IFN ad alte dosi (30.000 U/ml). Dopo 3 ore di trattamento con DMSO l'attività ODC è più del doppio rispetto alle cellule di controllo; tale stimolazione va man mano diminuendo e a 9 ore è ormai assente. Il trattamento combinato DMSO + IFN abolisce la stimolazione dell'ODC causata dal DMSO, riportando l'attività enzimatica ai valori del controllo non trattato.

La Fig. 2 mostra i valori dell'attività ODC in FLC trattate con 0,8 % DMSO, in presenza ed in assenza di IFN a basse dosi. In questo caso è stata scelta una concentrazione di DMSO più bassa che negli esperimenti descritti in precedenza, perché la stimolazione del differenziamento dovuta a basse dosi di IFN è più evidente in presenza di dosi subottimali di induttore, cioè quando il livello di base di differenziamento è del 30-40 %. In seguito al trattamento combinato DMSO + IFN si osserva a 3 ore una stimolazione dell'attività ODC, che è ancora presente dopo 6 ore di trattamento.

#### DISCUSSIONE.

La somministrazione di IFN esercita, in un ampio spettro di dosi (10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> U/ml) un effetto inibitorio specifico sull'attività ODC indotta dal trattamento con

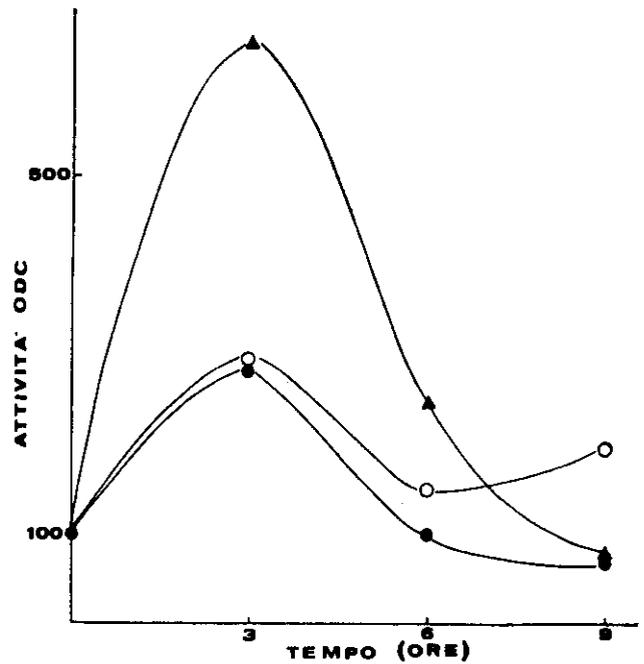


Fig. 1. - ODC in FLC trattate con alte dosi di IFN. I valori di attività enzimatica sono espressi come % del tempo 0  
○ FLC di controllo  
▲ FLC indotte con DMSO 1,5 %  
● FLC trattate con DMSO 1,5 % + IFN 30.000 U/ml

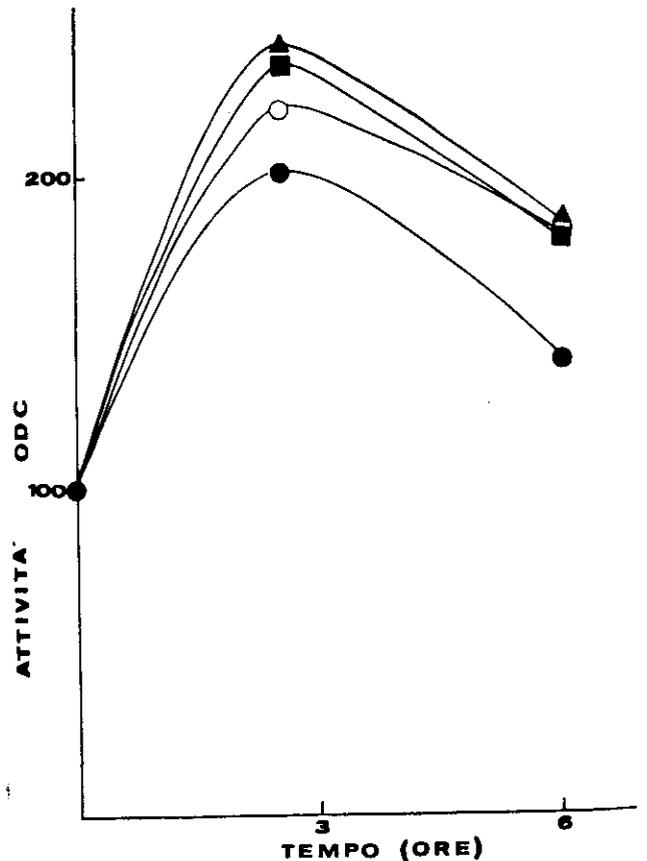


Fig. 2. - ODC in FLC trattate con basse dosi di IFN. I valori di attività enzimatica sono espressi come % del tempo 0  
● FLC trattate con DMSO 0,8 %  
○ FLC trattate con DMSO 0,8 % + IFN 30 U/ml  
▲ FLC trattate con DMSO 0,8 % + IFN 60 U/ml  
■ FLC trattate con DMSO 0,8 % + IFN 120 U/ml

siero [7] o con ormoni [8] in cellule Swiss 3T3. I dati qui riportati indicano che alte dosi di IFN sono inibitorie sull'attività ODC indotta in FLC nelle prime ore di trattamento con DMSO, mentre basse dosi esercitano l'effetto opposto.

Questi risultati concordano apparentemente con quelli relativi agli effetti di IFN sul differenziamento eritroide delle FLC, e si potrebbe dedurre che la stimolazione o l'inibizione dell'ODC sia il tramite attraverso cui IFN eserciti la sua azione sul differenziamento. Ci sono tuttavia da fare alcune considerazioni:

1) la precocità dell'effetto di IFN sull'ODC sembra escludere che esso sia mediato dalla stessa cascata di eventi molecolari che si verifica nei riguardi dell'azione antivirale classica;

2) gli effetti dell'IFN sul differenziamento delle FLC sono evidenti anche quando l'IFN viene somministrato alle colture parecchio tempo dopo la semina

in presenza di DMSO (fino a 24 ore dopo), cioè quando l'attività ODC è già tornata ai livelli basali. In questo caso l'IFN potrebbe modificare il secondo picco di ODC che si osserva tra 20 e 30 ore dopo l'inizio del trattamento con l'induttore.

In conclusione non si può dire se il parallelismo fra gli effetti dell'IFN sul differenziamento delle FLC e sull'attività ODC indotta dal trattamento con DMSO sia indicativo di un rapporto causa-effetto fra i due eventi. Per far luce su questo punto sono in corso esperimenti, analoghi a quelli descritti, su di una variante cellulare resistente all'IFN per quanto riguarda gli effetti antivirali.

Questo lavoro è stato in parte finanziato dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetto Finalizzato « Virus », Contratti nn. 80.00636.84 e 80.01952.84, e Progetto Finalizzato « Controllo della crescita neoplastica », Contratti n. 82.00297.96 e n. 82.00397.96.

#### BIBLIOGRAFIA

1. FRIEND, C. 1978. The phenomenon of differentiation in murine erythroleukemic cells. *Harvey Lectures. Series 72*: 253-291.
2. DOLEI, A., COLLETTA, G., CAPOBIANCHI, M. R., ROSSI, G. B. & VECCHIO, G. 1980. Interferon effects on Friend leukemia cells. 1) Expression of virus and erythroid markers in untreated and dimethylsulfoxide-treated cells. *J. Gen. Virol.* **46**: 227-236.
3. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PESCHLE, C. & AFFABRIS, E. 1980. Interactions of interferon with *in vitro* model systems involved in hematopoietic cell differentiation. *Ann. New York Acad. Sci.* **350**: 279-293.
4. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CIOÈ, L. & PESCHLE, C. 1982. Effects of interferon on erythropoietic differentiation. *Tex. Rep. Biol. Med.* **V. 41**: 381-387.
5. GAZITT, Y. & FRIEND, C. 1980. The possible role of polyamine biosynthetic enzymes in the induction of differentiation in Friend erythroleukemic cells. In: *In vivo and in vitro erythropoiesis: the Friend system*. G. B. Rossi (Ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 209-218.
6. GAZITT, Y. & FRIEND, C. 1980. Polyamine biosynthesis enzymes in the induction and inhibition of differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Cancer Res.* **40**: 1727-1732.
7. SREEVALSAN, T., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & ROZENGURT, E. 1979. Selective inhibition by interferon of serum-stimulated biochemical events in 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**: 679-685.
8. LEE, E. J., LARKIN, P. C. & SREEVALSAN, T. 1980. Differential effect of interferon on ornithine decarboxylase activation in quiescent Swiss 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**: 301-308.

## Effetti dell'interferone beta sull'espressione degli antigeni di istocompatibilità in varie linee cellulari umane

FRANCO AMEGLIO (a), ANTONINA DOLEI (b, c), MARIA ROSARIA CAPOBIANCHI (b), PATRIZIA PALLADINO (b) e ROBERTO TOSI (a)

(a) Laboratorio di Biologia Cellulare del CNR, Roma; (b) Istituto di Virologia, Università degli Studi, Roma;  
(c) Cattedra di Patologia Generale, Università di Camerino

**Riassunto.** - Linee cellulari umane di origine fibroblastica, epitelioide e linfoblastoide sono state trattate con interferone (IFN)  $\beta$ . Mediante dosaggio radioimmunologico sono stati misurati i livelli di HLA-A, B, C,  $\beta_2$ -microglobulina e antigeni Ia-simili nelle cellule e nei liquidi di coltura. Il trattamento con IFN  $\beta$  conferisce alle cellule lo stato antivirale e determina l'aumento dose-dipendente dell'espressione di antigeni di istocompatibilità. Tale aumento si verifica sia per gli antigeni associati alla cellula che per i prodotti rilasciati nel liquido di coltura.

**Summary** (Effects of interferon-Beta on the Expression of Hystocompatibility antigens in Human Cell Lines). - A wide spectrum of human cell lines was treated with human  $\beta$ -type interferon (IFN). Cell lysates and culture media were tested by radioimmunoassay for Ia-like, HLA-A, B, C and  $\beta_2$ -microglobulin content. An antiviral state was effectively induced by IFN in all cell lines tested. The same treatment enhanced the expression of cell-associated and shed histocompatibility antigens, dose-dependently.

### INTRODUZIONE.

L'interferone (IFN), pur essendo stato scoperto come sostanza antivirale, esercita numerose attività biologiche sulle funzioni cellulari. Tra queste ricordiamo quelle riguardanti l'inibizione della divisione cellulare [1], la modulazione del differenziamento [2], l'aumento della fagocitosi [3], l'influenza sull'espressione di alcuni antigeni di membrana [4] e la modulazione della risposta immune su cui interviene mediante: a) l'inibizione della risposta immunitaria anticorpale *in vitro* [5], b) l'aumento della citotossicità di linfociti sensibilizzati e delle cellule NK e c) la capacità di sopprimere la risposta cellulo-mediata sia *in vitro* che *in vivo* [6]. Anche gli antigeni del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) risentono dell'azione di IFN, che potrebbe intervenire modulandone le attività nella cooperazione cellulare immunologica [7].

Diversi Autori hanno già affermato che l'IFN fa aumentare l'espressione delle molecole MHC di membrana. Tali studi sono stati effettuati sia sul sistema murino (H-2) che su quello umano (HLA), utilizzando IFN leucocitario (IFN  $\alpha$ ) e cellule umane di natura lin-

foblastoide [8]. Le tecniche usate erano la citotossicità e l'immunofluorescenza e le dosi di IFN variavano da  $10^3$  a  $10^4$  unità/ml.

Il nostro gruppo ha studiato l'espressione di prodotti HLA dopo aver trattato con IFN umano fibroblastico (IFN  $\beta$ ) sei differenti linee cellulari umane. Gli antigeni saggati sono: molecole Ia-simili, HLA-A, B, C e  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m). Quest'ultima, pur non essendo codificata dalla regione HLA del VI autosoma, è presente sulla membrana cellulare associata alle molecole HLA-A, B, C, costituendone la catena leggera e risultando funzionalmente legata al sistema stesso.

I dosaggi sono stati effettuati mediante tecnica radioimmunologica (RIA) basata sull'inibizione della reazione tra antigene purificato e radiomarcato ed il corrispondente anticorpo specifico [9]. Il metodo è così riproducibile e sensibile da permettere anche la determinazione degli antigeni rilasciati nel liquido di coltura.

### MATERIALI E METODI.

**Cellule.** - Sono state usate le seguenti linee cellulari umane: E<sub>1</sub>SM (cellule diploidi derivate da cute embrionale), MG-63 (linea fibroblastoide derivata da osteosarcoma), Namalva (linfoblastoide di tipo B), HEp-2 (derivate da carcinoma laringeo) ed infine M10 ed M14 (derivanti da melanoma).

**Interferone.** - Le preparazioni, ottenute con tecniche abituali [10] il cui titolo variava da  $10^4$  a  $10^5$  U/ml, erano parzialmente purificate con solfato d'ammonio ottenendosi un'attività specifica di  $10^6$  U/mg di proteina. Per gli esperimenti sul controllo di specificità abbiamo usato IFN purificato ad omogeneità (Prep. 34370) di tipo  $\beta$  umano e siero anti IFN- $\beta$  umano (prep. 925) generosamente fornitoci dal Prof. A. Billiau, Rega Institute, Leuven. L'IFN era titolato mediante inibizione dell'effetto citopatico su cellule E<sub>1</sub>SM in micro-metodo, usando il virus della stomatite vescicolare (VSV) come rivelatore. Una unità di IFN così titolata è pari a 2 unità di riferimento.

In un esperimento tipo le cellule sono seminate a metà della densità di saturazione e l'IFN è somministrato al momento della semina. Le colture, raccolte

24-48 h dopo, vengono lavate 2 volte con PBS e congelate a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Per le cellule aderenti al vetro vengono allestite colture in parallelo che sono tripsinizzate e contate.

**Stato antivirale.** - Dopo 24 h dall'aggiunta di IFN, le cellule erano infettate con VSV (5 PFU/cellula) e, dopo 1 h di adsorbimento a  $37^{\circ}\text{C}$ , scartato l'inoculo, incubate con terreno nuovo. Dopo 18 h il VSV era raccolto e la resa virale titolata per placche su cellule  $\text{L}_{929}$ .

**Antigeni  $^{125}\text{I}$ -marcati.** -  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m), dono del Dr. N. Tanigaki (Rosswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y.), HLA-A, B, C, preparato secondo metodi già pubblicati [11] e molecole Ia, ottenute da cellule U 698 e purificate come in [12], sono stati marcati secondo metodi descritti precedentemente [11].

**Inibitori.** - Nei saggi RIA sono stati usati sia i lisati cellulari che i fluidi di coltura. Le cellule erano lavate 2 volte con PBS e risospese in 0,075 M Tris-HCl, pH 7,8 contenente il 2% Renex-30. I supernatanti erano saggati dopo estesa dialisi contro 0,075 M Tris-HCl, pH 7,8 e aggiunta di Renex-30 (2% concentrazione finale).

**Antisieri.** - Sono stati usati i seguenti antisieri: siero anti- $\beta_2$ -m, prep. 7147-2; siero anti-HLA-A, B, C, prep. 6095; siero anti-Ia, prep. 5895.

**Saggio radioimmunologico.** - Il saggio si basa sul fatto che gli inibitori (cellule o supernatanti dializzati) impediscono la precipitazione dell'antigene radiomarcato per competizione sull'antisiero. Il metodo è stato precedentemente pubblicato in dettaglio [12].

Un lisato cellulare di M14 (linea che esprime tutti e tre gli antigeni), diviso in aliquote e congelato a  $-70^{\circ}\text{C}$ , era aggiunto come standard in ogni saggio. I valori ottenuti in quattro differenti esperimenti erano sufficientemente riproducibili ed il coefficiente di variazione (deviazione standard/media) non eccedeva il 15% per ciascuno dei tre antigeni esaminati. Le unità in cui vengono espressi i risultati sono arbitrarie ( $1 \text{ UI}_{50}$  è la quantità che inibisce la precipitazione del 50% della radioattività precipitata dal controllo positivo) e, pertanto, non confrontabili in valore assoluto per i diversi antigeni; il confronto è stato effettuato soltanto sugli incrementi rispetto al controllo.

## RISULTATI.

La Tab. 1 mostra gli effetti di IFN sulla vitalità cellulare e sulla resa virale delle sei linee cellulari prese in esame. Il trattamento con 5000 U/ml di IFN  $\beta$  non modifica la vitalità cellulare (misurata col metodo della esclusione della nigrosina); nello stesso tempo in tutte le linee cellulari c'è una riduzione della resa virale di almeno 2 unità logaritmiche. La sintesi proteica totale non subisce modificazioni significative in presenza della stessa quantità di IFN (dati non mostrati).

La Fig. 1 mostra gli effetti di varie dosi di IFN sull'espressione cellulare e sul rilascio di HLA-A, B, C,  $\beta_2$ -m e Ia. Tutte le linee cellulari saggiate esprimono HLA-A, B, C e  $\beta_2$ -m a livello cellulare, mentre le molecole Ia sono espresse soltanto da Namalva, M10 ed M14. Per quanto riguarda il rilascio degli antigeni nei liquidi di coltura, tutte le cellule liberano  $\beta_2$ -m, mentre solo HEP-2, M10 ed M14 rilasciano HLA-A,

Tabella 1. - Effetti di IFN fibroblastico sulla vitalità cellulare e resa virale dopo infezione in varie linee cellulari.

Linee cellulari		Vitalità %		Resa virale (Log PFU/ml)	
Nome	Origine	Controllo	Trattato con IFN	Controllo	Trattato con IFN
E <sub>1</sub> SM ...	Cute e muscolo embrionari	96,2	94,1	10,3	4,9
MG-63 ..	Osteosarcoma	96,1	96,3	9,3	5,8
Namalva .	Linfoma di Burkitt	97,4	94,2	6,8	4,5
HEp-2 ..	Carcinoma laringeo	96,3	94,5	8,6	5,9
M10 ....	Melanoma	94,8	96,1	8,4	6,2
M14 ....	Melanoma	97,2	93,5	7,5	4,7

Cellule cresciute in presenza di 5.000 U/ml di interferone parzialmente purificato e somministrato per 24 ore.

B, C. Gli antigeni Ia risultano dosabili solo nei supernatanti di M10 ed M14. La quantità di antigeni presenti nelle cellule e rilasciati nei liquidi nutritivi è molto variabile, e dipende sia dal tipo di cellula che dall'antigene preso in considerazione. Per questa ragione i dati sono espressi come percentuale del controllo, in modo da poterli confrontare. Il trattamento con IFN determina un incremento dose-dipendente della quantità di antigeni MHC, sia nelle cellule che nei fluidi di coltura.

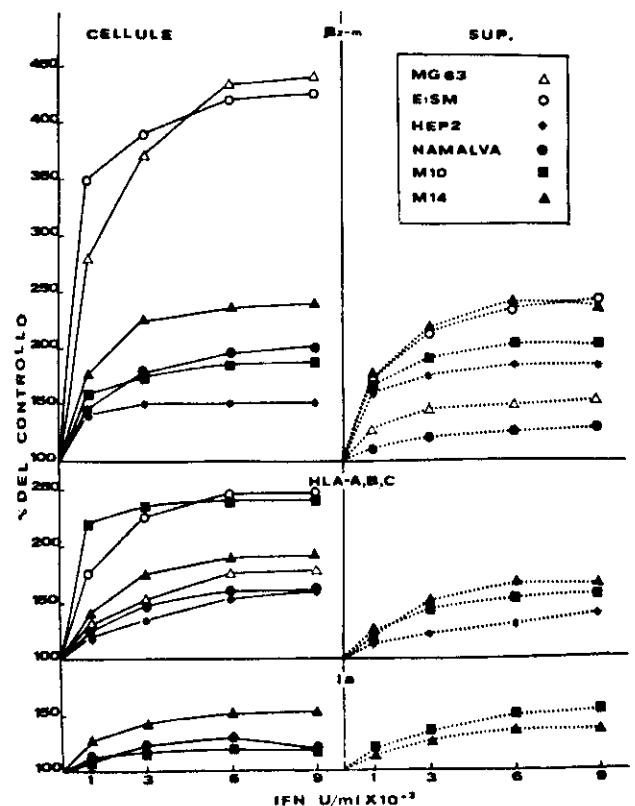


FIG. 1. - Espressione e rilascio di HLA-A, B, C,  $\beta_2$ -m e Ia in varie linee cellulari trattate con IFN. Le cellule, seminate in presenza di varie dosi di IFN  $\beta$ , erano raccolte 24 ore dopo e saggiate per i vari antigeni come descritto nei « Metodi ». Tale dosaggio veniva effettuato anche per i liquidi di coltura. I risultati sono espressi come % rispetto al controllo non trattato

Tuttavia l'IFN non determina la comparsa di antigeni, in particolare Ia, se essi non sono già espressi dalla linea cellulare in esame.

Per escludere la possibilità che gli effetti osservati siano dovuti a qualche contaminante presente nelle preparazioni di IFN, abbiamo fatto alcuni esperimenti di controllo, usando IFN  $\beta$  purificato ad omogeneità e antisiero specifico. La Fig. 2 mostra l'effetto di IFN  $\beta$  puro, pretrattato o meno con un eccesso di antisiero specifico, sull'espressione degli antigeni Ia nelle cellule M14. Il trattamento con 4.000 U/ml di IFN determina un raddoppio dell'espressione degli antigeni Ia; il pretrattamento di IFN con antisiero specifico abolisce tale stimolazione. La resa virale, mostrata nella parte inferiore della Fig. 2, concorda con gli effetti di IFN sull'Ia: infatti essa è sensibilmente ridotta dopo trattamento delle cellule con IFN  $\beta$ , ma rimane inalterata se l'IFN è stato pretrattato con antisiero specifico.

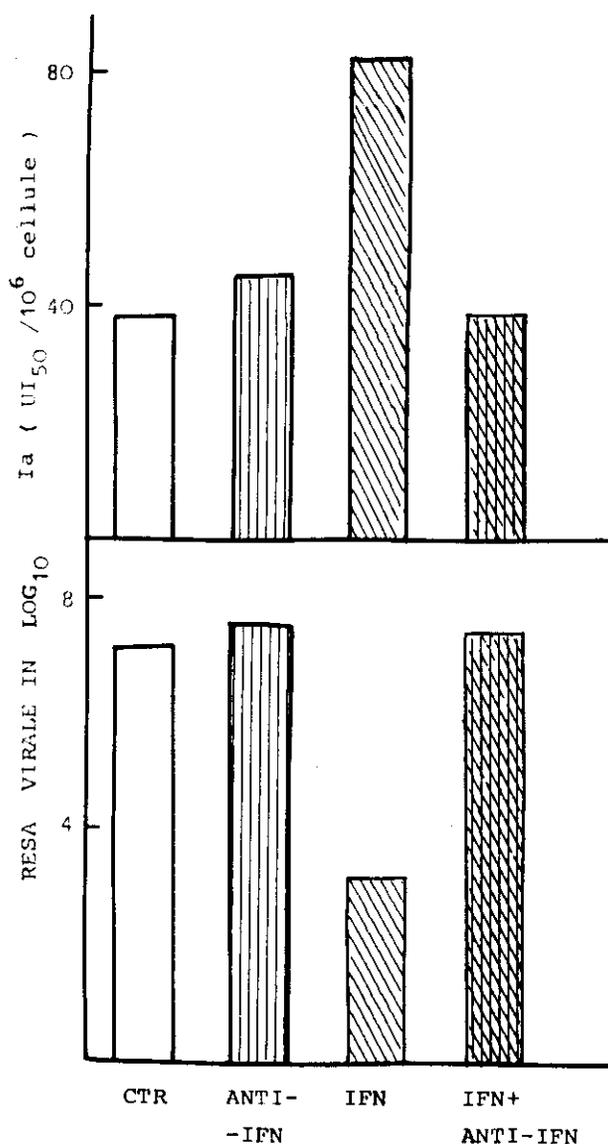


FIG. 2. - Effetto del trattamento con IFN  $\beta$  puro umano con/senza siero anti-IFN  $\beta$  umano sull'espressione di molecole Ia e sulla risposta all'infezione virale in cellule M14. Le cellule, seminate in presenza di 4.000 UI/ml di IFN  $\beta$  umano, preincubato con/senza un eccesso di siero anti-IFN  $\beta$  umano a 4°C per 90 minuti, dopo 48 ore erano raccolte e trattate come descritto nei «Metodi»

## DISCUSSIONE.

Ci sono numerosi dati in letteratura sull'effetto di IFN sull'espressione degli antigeni MHC; tuttavia tali studi, riguardanti l'IFN  $\alpha$ , erano limitati all'espressione di tali antigeni a livello cellulare e solo recentemente sono apparsi dati sul rilascio della  $\beta_2$ -m [8] in colture di cellule trattate con IFN  $\alpha$ .

Nel presente studio sono riportati dati sull'azione di  $\beta$  IFN sull'espressione cellulare e sul rilascio di tre classi di molecole del sistema MHC: HLA-A, B, C,  $\beta_2$ -m ed Ia. I dati riportati indicano che:

- 1) l'IFN esercita un'azione stimolante sull'espressione di tali antigeni (Fig. 1);
- 2) tale effetto non è dovuto all'inibizione del rilascio degli antigeni nei fluidi di coltura, perché anche il rilascio è aumentato dopo trattamento con IFN (Fig. 1);
- 3) l'aumento del rilascio degli antigeni MHC non è dovuto ad effetti tossici aspecifici, perché la vitalità cellulare non è modificata (Tab. 1);
- 4) il trattamento con IFN non induce l'espressione o il rilascio di molecole che non siano già rispettivamente espresse e rilasciate dalla cellula non trattata (Fig. 1).

I dati disponibili in letteratura indicano che IFN  $\alpha$  non ha effetti sull'espressione degli antigeni Ia. I nostri dati indicano che IFN  $\beta$  invece ha un effetto stimolante sull'espressione di tali antigeni, e che tale effetto è specifico (Fig. 2). Questa differenza di comportamento tra i due tipi di IFN riflette forse una differenza di ruolo fra i due tipi di IFN nella modulazione del sistema immunitario. Tuttavia è difficile fare speculazioni definitive sul significato dell'azione di IFN su espressione e rilascio degli antigeni del sistema MHC. A questo riguardo vale la pena soffermarsi su alcune funzioni che si stanno via via attribuendo a questi antigeni: gli antigeni Ia sono probabilmente il prodotto dei geni Ir, che modulano la risposta immune; più in generale tutte e tre le classi di molecole esaminate sono coinvolte nel controllo della risposta immune [13]. Gli antigeni MHC hanno inoltre un ruolo nel riconoscimento e nell'eliminazione di cellule infettate da virus da parte dei linfociti T-citotossici. Inoltre, il notevole divario fra l'incremento del rilascio della  $\beta_2$ -m dopo trattamento con IFN e il corrispondente aumento del rilascio di HLA-A, B, C che si osserva in alcune linee cellulari (MG-63 ed E<sub>1</sub>SM) è indicativo di una possibile estensione degli effetti di IFN ad altre strutture di membrana, di cui è nota l'associazione con la  $\beta_2$ -m (TL-simili, H-y e Qa-2) [14].

Si può pertanto concludere che una conoscenza più dettagliata delle funzioni delle strutture di membrana è necessaria per valutare l'importanza dei cambiamenti quantitativi evidenziabili dopo trattamento con IFN nell'ottica del ruolo, ormai da tutti accettato, che questo ultimo sostiene nella modulazione delle funzioni immunitarie.

Questo lavoro è stato finanziato in parte dal C.N.R., Progetti Finalizzati «Virus», Contratto n. 80.0036.84 e «Controllo della Crescita Neoplastica», Contratti n. 82.00297.96 e n. 82.00397.96.

## BIBLIOGRAFIA

1. MATARESE, G. P. & ROSSI, G. B. 1978. Effect of interferon on growth and division cycle of Friend erythroleukemic cells *in vitro*. *J. Cell. Biol.* **75**: 344-355.
2. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PESCHLE, C. & AFFABRIS, E. 1980. Interactions of interferon with *in vitro* model systems involved in hematopoietic cell differentiation. *Ann. New York Acad. Sci.* J. Vilcek, I. Gresser & T. C. Merigan (Eds.) Pp. 279-293.
3. HUANG, E., DONAHOE, R. M., GORDON, F. B. & DRESSLER, H. R. 1971. Enhancement of phagocytosis by interferon-containing preparation. *Infect. Immunol.* **4**: 581-588.
4. GRESSER, I. 1977. On the varied biologic effects of interferon. *Cell. Immunol.* **34**: 406-411.
5. JOHNSON, H. M. & BARON, S. 1976. Interferon effects on the immune response and the mechanism of activation of the cellular response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4**: 203-209.
6. JOHNSON, H. M., STANTON, G. J. & BARON, S. 1977. Relative ability of mitogens to stimulate production of interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the *in vitro* immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **154**: 138-143.
7. LINDHAL, P., LEARY, P. & GRESSER, I. 1973. Enhancement by interferon of the expression of surface antigens on murine leukemia L<sub>1210</sub> cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **70**: 2785-2788.
8. FELLOUS, M., BONO, R., HYAFIL, F. & GRESSER, I. 1981. Interferon enhances the amount of membrane-bound  $\beta_2$ -microglobulin and its release from human Burkitt cells. *Eur. J. Immunol.* **11**: 524-526.
9. TOSI, R., TANIGAKI, N., CENTIS, D., ROSSI, P. L., ALFANO, G., FERRARA, G. B. & PRESSMAN, D. 1980. HLA-DR typing by radioimmunoassay. *Transplantation.* **29**: 302-305.
10. DOLEI, A., COLLETTA, G., CAPOBIANCHI, M. R., ROSSI, G. B. & VECCHIO, G. 1980. Interferon effects on Friend leukemia cells. I) Expression of viral and erythroid markers in untreated and dimethyl sulfoxide-treated cells. *J. Gen. Virol.* **46**: 227-236.
11. HENRIKSEN, O., APPELLA, E., SMITH, D. F., TANIGAKI, N. & PRESSMAN, D. 1976. Comparative chemical analyses of the alloantigenic fragments of HLA antigens. *J. Biol. Chem.* **251**: 4214-4219.
12. TANIGAKI, N., TOSI, R., PRESSMAN, D. & FERRARA, G. B. 1980. Molecular identification of human Ia antigens coded for by a gene locus closely linked to HLA-DR locus. *Immunogenetics.* **10**: 151-167.
13. KATZ, D. H., ARMERDING, D. & ESNHAR, Z. 1976. Histocompatibility gene products as mediators of lymphocyte interactions. In: *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses*. D. Katz & D. Benacerraf (Eds.). Academic Press Inc, New York, pp. 541-552.
14. VITETTA, E., UHR, W. & BOYSE, E. A. 1975. Association of a  $\beta_2$ -microglobulin-like subunit with H-2 and TL alloantigens on murine thymocytes. *J. Immunol.* **114**: 252-254.

## BIBLIOGRAFIA

1. MATARESE, G. P. & ROSSI, G. B. 1978. Effect of interferon on growth and division cycle of Friend erythroleukemic cells *in vitro*. *J. Cell. Biol.* **75**: 344-355.
2. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PESCHLE, C. & AFFABRIS, E. 1980. Interactions of interferon with *in vitro* model systems involved in hematopoietic cell differentiation. *Ann. New York Acad. Sci.* J. Vilcek, I. Gresser & T. C. Merigan (Eds.) Pp. 279-293.
3. HUANG, E., DONAHOE, R. M., GORDON, F. B. & DRESSLER, H. R. 1971. Enhancement of phagocytosis by interferon-containing preparation. *Infect. Immunol.* **4**: 581-588.
4. GRESSER, I. 1977. On the varied biologic effects of interferon. *Cell. Immunol.* **34**: 406-411.
5. JOHNSON, H. M. & BARON, S. 1976. Interferon effects on the immune response and the mechanism of activation of the cellular response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **4**: 203-209.
6. JOHNSON, H. M., STANTON, G. J. & BARON, S. 1977. Relative ability of mitogens to stimulate production of interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the *in vitro* immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **154**: 138-143.
7. LINDHAL, P., LEARY, P. & GRESSER, I. 1973. Enhancement by interferon of the expression of surface antigens on murine leukemia L<sub>1210</sub> cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **70**: 2785-2788.
8. FELLOUS, M., BONO, R., HYAFIL, F. & GRESSER, I. 1981. Interferon enhances the amount of membrane-bound  $\beta_2$ -microglobulin and its release from human Burkitt cells. *Eur. J. Immunol.* **11**: 524-526.
9. TOSI, R., TANIGAKI, N., CENTIS, D., ROSSI, P. L., ALFANO, G., FERRARA, G. B. & PRESSMAN, D. 1980. HLA-DR typing by radio-immunoassay. *Transplantation*. **29**: 302-305.
10. DOLEI, A., COLLETTA, G., CAPOBIANCHI, M. R., ROSSI, G. B. & VECCHIO, G. 1980. Interferon effects on Friend leukemia cells. I) Expression of viral and erythroid markers in untreated and dimethyl sulfoxide-treated cells. *J. Gen. Virol.* **46**: 227-236.
11. HENRIKSEN, O., APPELLA, E., SMITH, D. F., TANIGAKI, N. & PRESSMAN, D. 1976. Comparative chemical analyses of the alloantigenic fragments of HLA antigens. *J. Biol. Chem.* **251**: 4214-4219.
12. TANIGAKI, N., TOSI, R., PRESSMAN, D. & FERRARA, G. B. 1980. Molecular identification of human Ia antigens coded for by a gene locus closely linked to HLA-DR locus. *Immunogenetics*. **10**: 151-167.
13. KATZ, D. H., ARMERDING, D. & ESNHAR, Z. 1976. Histocompatibility gene products as mediators of lymphocyte interactions. In: *The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses*. D. Katz & D. Benacerraf (Eds.). Academic Press Inc, New York, pp. 541-552.
14. VITETTA, E., UHR, W. & BOYSE, E. A. 1975. Association of a  $\beta_2$ -microglobulin-like subunit with H-2 and TL alloantigens on murine thymocytes. *J. Immunol.* **114**: 252-254.

## Effetti dell'interferone sull'espressione cellulare e sul rilascio degli antigeni Ia: paragone tra gli interferoni $\alpha$ e $\beta$ umani

ANTONINA DOLEI (a, b), FRANCO AMEGLIO (c), MARIA ROSARIA CAPOBIANCHI (a), PATRIZIA PALLADINO (a)  
e ROBERTO TOSI (c)

(a) Istituto di Virologia, Università degli Studi, Roma; (b) Cattedra di Patologia Generale, Università di Camerino;  
(c) Laboratorio di Biologia Cellulare del C.N.R., Roma

**Riassunto.** - Cellule umane epitelioidi e linfoblastoidi che esprimono antigeni Ia sono state trattate con interferoni (IFN)  $\alpha$  e  $\beta$ . I dati ottenuti mediante dosaggio radioimmunologico degli antigeni Ia in toto e di singoli prodotti genici, come DC e DR, indicano che IFN  $\alpha$  e  $\beta$  possono avere effetti differenti sulle proteine di membrana, in relazione anche al sistema cellulare in esame. In ogni caso viene sempre instaurato lo stato antivirale nelle cellule trattate. La possibilità di effetti differenziali dei vari tipi di IFN è di notevole importanza per le possibili implicazioni nell'immunità cellulo-mediata e nei processi difensivi in generale.

**Summary** (Interferon Effects on Expression and Release of Ia Antigens. A Comparison between  $\alpha$  and  $\beta$  Human Interferons). - Expression and shedding of Ia-like antigens were evaluated in epithelioid and lymphoblastoid human cell lines treated with human  $\alpha$ - and  $\beta$ -type interferons (IFN). Cells were tested by radioimmunoassay for expression of total Ia antigens and of specific Ia products, such as DC and DR. Results indicated that  $\alpha$  and  $\beta$  IFN may affect cell membrane components in different ways, and may therefore have specific effects on the in vivo interactions between cells involved in immune responses.

### INTRODUZIONE.

Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) è composto nell'uomo da due classi di molecole: a) HLA di Classe I, o HLA classico, controllata dai loci HLA-A, B, C, i cui prodotti genici sono legati, sulla membrana cellulare, alla  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m) che pur non essendo sotto il controllo dei geni MHC, tuttavia, da un punto di vista funzionale, ne segue intimamente le sorti; b) HLA di Classe II, o antigeni Ia, costituiti da due subunità che sporgono entrambe dalla membrana cellulare. Nell'uomo sono state identificate in precedenza 10 varianti di molecole Ia, controllate ciascuna da un allele per un singolo locus, detto HLA-DR. Recentemente il gruppo di Tosi e Tanigaki [1] ha raccolto dati che dimostrano l'esistenza non di uno, ma di tre loci in questa regione. Oltre al primo locus, che come già detto è il DR, esiste il DC, il cui allele DC1 è legato con alta frequenza agli alleli 1, 2 e 6 del DR,

ed il terzo locus BR, il cui allele BR4  $\times$  7 è legato con alta frequenza con gli alleli 4 e 7 del DR.

Il nostro gruppo si occupa da tempo dello studio degli effetti non antivirali dell'interferone (IFN [2, 3]). Sugli effetti cellulari di IFN, infatti, si stanno raccogliendo evidenze numerose [4]; si sta cominciando inoltre a chiarire anche la complessità del sistema IFN stesso, i cui differenti tipi non sempre esercitano effetti sovrapponibili. Abbiamo studiato in particolare l'azione di IFN sull'espressione di antigeni di istocompatibilità umani, ed una parte dei risultati viene trattata in un altro contributo al presente volume [5]. Sono stati usati sia IFN umano di tipo  $\beta$  (fibroblastico), che di tipo  $\alpha$  (leucocitario). I dati ottenuti indicano che entrambi gli IFN inducono nelle cellule lo stato antivirale e che hanno effetti sull'espressione di antigeni di istocompatibilità, ma che non si comportano sempre in maniera sovrapponibile.

### MATERIALI E METODI.

**Cellule.** - Sono state usate le seguenti linee cellulari umane: E<sub>1</sub>SM (fibroblasti diploidi di cute e muscolo embrionario), Namalva (cellule linfoblastoidi B) ed M14 (cellule epitelioidi derivate da melanoma).

**Interferoni.** - Interferone umano  $\beta$  parzialmente purificato è stato ottenuto su cellule E<sub>1</sub>SM con metodiche note [3]. L'attività specifica di varie preparazioni si aggira intorno a  $10^6$  unità/mg di proteina. Interferone umano  $\alpha$  parzialmente purificato è stato ottenuto dal Dr. K. Cantell (Central Public Health Laboratory, Helsinki) tramite il Prof. G.B. Rossi (Istituto Superiore di Sanità, Roma); l'attività specifica è di  $10^6$  unità/mg di proteina. La titolazione degli IFN e la determinazione dello stato antivirale sono state eseguite secondo quanto descritto nella ref. [4]. Nel nostro sistema 1 unità di IFN  $\beta$  equivale a 2 unità internazionali ed 1 unità di IFN  $\alpha$  equivale a 0,5 unità internazionali.

**Dosaggio radioimmunologico.** - La preparazione degli antigeni purificati e marcati con iodio radioattivo è stata descritta in un altro contributo al presente volume [5]. Anche per la descrizione degli inibitori, degli antisieri e del dosaggio radioimmunologico si rimanda alla ref. [5].

Tabella 1. - Effetto dell'IFN  $\alpha$  e  $\beta$  sull'espressione di prodotti MHC in cellule M14 e Namalva.

		HLA-A,B,C. (UI <sub>50</sub> /10 <sup>6</sup> cell.)			$\beta_2$ -m UI <sub>50</sub> /10 <sup>6</sup> cell.)			Ia (UI <sub>50</sub> /10 <sup>6</sup> cell.) <sup>a</sup>		
		ctr	+IFN $\alpha$	+IFN $\beta$	ctr	+IFN $\alpha$	+IFN $\beta$	ctr	+IFN $\alpha$	+IFN $\beta$
M14	Cellule	16	33	34	81	163	192	40	39	59
	Fluidi	11	16	20	186	442	470	19	20	28
Namalva	Cellule	12	21	18	10	20	21	24	32	30
	Fluidi	0	0	123	n.e.	146	0	0	0	0

Le cellule sono state trattate per 48 ore con 2000 U/ml di IFN  $\alpha$  o  $\beta$ .  
n.e. = non eseguito.

## RISULTATI.

*Confronto dell'effetto di IFN  $\alpha$  e di IFN  $\beta$  sull'espressione dei prodotti MHC.* - La Fig. 1 mostra i livelli di HLA-A, B, C e di  $\beta_2$ -m nelle cellule E<sub>1</sub>SM trattate per 48 h con 2.000 unità/ml di IFN  $\alpha$  o  $\beta$ . In queste cellule l'espressione dei due antigeni è aumentata dopo il trattamento con ciascuno dei due tipi di IFN, con andamento dose-dipendente. Non si apprezzano differenze significative nell'effetto dei due tipi di IFN su questi fibroblasti normali diploidi.

Nella Tab. 1 sono riportati i valori dei prodotti MHC in due linee cellulari umane neoplastiche: cellule M14 e Namalva. In questo caso sono stati misurati i valori dei prodotti MHC anche nei fluidi di coltura. Ancora

una volta si osserva che i livelli di HLA-A, B, C e  $\beta_2$ -m sono aumentati dopo trattamento con IFN, in entrambe le linee cellulari, senza particolari differenze tra i due tipi di IFN, sia per quanto riguarda gli antigeni cellula-associati che per quelli rilasciati nel liquido di coltura. Nell'espressione degli antigeni Ia, invece, sono state trovate delle differenze. Infatti le cellule M14 trattate con IFN  $\beta$  esprimono e liberano nel terreno di coltura una quantità maggiore di Ia rispetto ai controlli, mentre questo non si verifica dopo trattamento con IFN  $\alpha$ . Nelle cellule Namalva, invece, i due tipi di IFN hanno pressappoco lo stesso effetto. Si è ritenuto opportuno quindi andare a studiare con maggiore dettaglio i prodotti genici dei vari loci dell'Ia. I dati finora disponibili sono relativi alle cellule Namalva, che non rilasciano Ia dalla membrana, e riguardano l'Ia *in toto*, il DC1 e il DRw2. Come riportato nella Tab. 2, in questa linea cellulare non abbiamo trovato differenze significative tra i due IFN, né sull'Ia *in toto*, né in due dei tre loci Ia. Sono in corso di elaborazione i dati relativi al terzo locus in queste cellule e a tutti e tre i loci nelle cellule di melanoma.

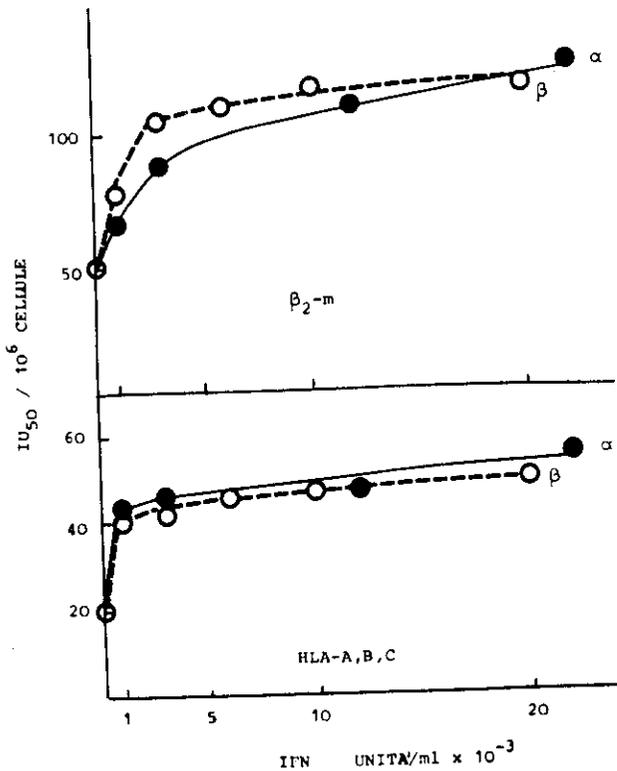


FIG. 1. - Effetto di IFN  $\alpha$  e  $\beta$  sull'espressione di prodotti MHC in cellule E<sub>1</sub>SM. Le colture sono state trattate con IFN alle dosi indicate. Dopo 48 h le cellule sono state raccolte, lavate e lisate come in [3, 5] ed usate come inibitori in dosaggio radioimmunologico (RIA). I dati ottenuti sono espressi come unità inibenti il 50% (UI<sub>50</sub>)/10<sup>6</sup> cellule

Tabella 2. - Espressione di antigeni Ia in cellule Namalva trattate con IFN  $\alpha$  e  $\beta$ .

	Ia in toto	DRw2	DC <sub>1</sub>
Controllo	13	17	6
+ IFN $\alpha$	18	25	7
+ IFN $\beta$	15	21	8

Le cellule sono state trattate per 48 h con 2.000 U/ml di IFN  $\alpha$  o  $\beta$ . I dati sono espressi come UI<sub>50</sub>/10<sup>6</sup> cellule.

## DISCUSSIONE.

Anche se necessitano ulteriori esperimenti, tuttavia i dati esposti in questo lavoro indicano che differenti tipi di IFN possono avere effetti diversi sulle proteine di membrana, in relazione anche al tipo di cellula in esame.

Per comprendere il significato delle variazioni quantitative dei livelli di Ia e di altri prodotti MHC dopo trattamento con IFN, va tenuto presente che l'IFN

esplica molteplici effetti sui processi immunitari, e non sono chiari i meccanismi molecolari mediante i quali essi si verificano. Sembra verosimile che almeno alcuni di questi meccanismi possano essere mediati da un effetto dell'IFN sugli antigeni di istocompatibilità. È noto ad esempio che nei meccanismi di riconoscimento di antigeni che precedono la sintesi di anticorpi specifici, il controllo avviene per opera di geni localizzati nel complesso maggiore di istocompatibilità, i cosiddetti geni Ir [6], o geni della risposta immune, i cui prodotti sembrano essere proprio gli antigeni Ia. Inoltre gli antigeni HLA-A, B, C sono implicati nell'uccisione specifica da parte di linfociti T, di cellule virus-infette [7], e la  $\beta_2$ -m è stata chiamata in causa quale possibile recettore di alcuni virus [8].

Anche il rilascio di questi antigeni non è sicuramente

privo di significato. Per esempio si sa che i macrofagi rilasciano antigeni Ia che possono venire assunti da linfociti T, per cui ogni cambiamento sia nella quantità totale di questi antigeni sia nelle proporzioni relative tra i vari prodotti può avere un ruolo nelle comunicazioni cellula-cellula, con conseguenze nelle varie attività cellulari. Sembra possibile quindi che l'azione differenziale di IFN  $\alpha$  e  $\beta$  sull'espressione e rilascio di antigeni di istocompatibilità possa avere un ruolo importante nella modulazione della risposta immune.

Questo lavoro è stato finanziato in parte dal C.N.R., Progetti Finalizzati "Virus", Contratto n. 80.0036.84, e "Controllo della Crescita Neoplastica", Contratti n. 82.00297.96 e n. 82.00397.96.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CORTE, C., CALABI, F., DAMIANI, G., BARGELLES, A., TOSI, R. & SORRENTINO, R. 1981. Human Ia molecules carrying DC1 determinants differ in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits from Ia molecules carrying DR determinants. *Nature*. **292**: 357-360.
2. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PESCHLE, C. & AFFABRIS, E. 1980. Interactions of interferon with *in vitro* model systems involved in hematopoietic cell differentiation. *Ann. New York Acad. Sci.* J. Vilcek, I. Gresser & T. C. Merigan (Eds.). Pp. 279-293.
3. DOLEI, A., AMEGLIO, F., CAPOBIANCHI, M. R. & TOSI, R. 1981. Human  $\beta$ -type interferon enhances the expression and shedding of Ia-like antigens. Comparison to HLA-A, B, C and  $\beta_2$ -microglobulin. *Antiviral Res.* **1**: 367-372.
4. SONNENFELD, G. 1980. Modulation of immunity by interferon. *Lymphokine Rep.* **1**: 113-132.
5. AMEGLIO, F., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PALLADINO, P. & TOSI, R. 1982. Effetti dell'interferone beta sull'espressione degli antigeni di istocompatibilità in varie linee cellulari umane. Atti del Convegno Interdisciplinare di Microbiologia Medica, Soc. Microbiol., Sez. Laziale. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **18** (3): 413-416.
6. MC DEVITT, H. O. & BENACERRAF, B. 1969. Genetic control of specific immune responses. *Adv. Immunol.* **11**: 31-43.
7. ZINKERNAGEL, R. M. & DOHERTY, P. C. 1975. H-2 compatibility requirement for T cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocyte choriomeningitis virus. Different cytotoxic T cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J. Exp. Med.* **141**: 1427-1432.
8. HELENIUS, A., MOREIN, B., FRIES, E., SIMON, K., ROBINSON, P., SCIRRMACHER, V., TERHOST, C. & STROMINGER, J. L. 1978. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **75**: 3846-3850.

## Interferone fibroblastico umano: produzione e caratterizzazione in una linea di cellule amniotiche

VINCENZO SORRENTINO (a), PAOLO DI FRANCESCO (a), MARCO SORIA (a) e GIOVANNI BATTISTA ROSSI (b)

(a) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma;

(b) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - Una linea cellulare di Amnios umana (UAC) produce alti titoli di interferone fibroblastico (80.000-100.000 IU/ml; 100-150 IU/10<sup>3</sup> cellule). Le cellule UAC hanno un breve tempo di duplicazione di ~24 h e non richiedono siero fetale nel terreno di crescita. L'IFN prodotto è stato caratterizzato come  $\beta$ -IFN umano saggiandone l'attività con cellule omologhe ed eterologhe e da test di neutralizzazione con antisieri specifici. L'IFN è stato purificato a  $0,6 \times 10^7$  IU/mg di proteine su Blue Sepharose. La traduzione in lisati di reticulociti di coniglio di RNA poly A+ da UAC indotte codifica la produzione di 300-600 IU/ml di IFN.

**Summary (Fibroblastic Human Interferon: Production and Characterization an Amnion Cell Line).** - A line of human Amnion cells (UAC) yields high titers of fibroblastic IFN (80.000-100.000 IU/ml; 100-150 IU/10<sup>3</sup> cells). UAC have a doubling time of ~24 h, do not require fetal calf serum for growth. IFN produced was typed as  $\beta$ -IFN by assaying it on homologous vs heterologous cells, and by neutralization tests with specific antisera. UAC-IFN can be readily purified to  $0,6 \times 10^7$  IU/mg protein on Blue Sepharose. In reticulocyte lysates addition of 8  $\mu$ g results in the production of 300-600 IU/ml of IFN.

### INTRODUZIONE.

Nonostante siano passati circa 20 anni dalla scoperta, da parte di Isaacs e Lindemann [1], dell'interferone (IFN), esso è stato purificato solo recentemente, a causa delle notevoli difficoltà nel produrne grandi quantità. Nel sistema murino esistono diverse linee cellulari che producono alti livelli di IFN [2, 3]. Le linee cellulari umane non si sono, invece, rivelate altrettanto efficienti nel produrre IFN ad alto titolo. L'IFN  $\beta$  umano è, infatti, essenzialmente prodotto da colture primarie di fibroblasti, sistema in cui la produzione di IFN è, però, limitata dal basso rapporto resa/cellula (5-30 IU/10<sup>3</sup> cellule) e dal lungo tempo di crescita dei fibroblasti primari umani (~7 giorni) [4].

In questo lavoro noi descriviamo una linea di cellule amniotiche umane, U Amnios Cells (UAC), fornita dal Dr. Kari Cantell, Central Public Health Service Laboratories, Helsinki, Finland. È una linea usata per la titolazione dell'IFN, ma non conosciuta come produttrice di IFN ad alti livelli. Queste cellule si prestano

alla preparazione di IFN ad alto titolo, in quanto producono notevoli quantità di interferone, presentano un veloce tempo di duplicazione e non richiedono l'aggiunta di siero fetale nel terreno di crescita.

### MATERIALI E METODI.

**Cellule.** - Le cellule UAC sono state coltivate in Minimum Essential Medium (MEM), addizionato con Siero di Vitello Neonato (NCS), e subcoltivate ogni 3 giorni. Le cellule di rene bovino (MDBK), venivano passate ogni 4 giorni in MEM + 10% Siero Fetale (FCS). Fibroblasti embrionali umani (E<sub>1</sub>SM), ottenuti dal Dr. Billiau, Rega Institute, Leuven, Belgio, erano coltivati in MEM 10% FCS e passati ogni 7 giorni.

**Virus.** - Stocks di virus Sendai e di virus della malattia di Newcastle (NDV) erano prodotti in uova di pollo embrionate, inoculate in 10<sup>a</sup> giornata; il liquido allantoideo veniva raccolto dopo 2 giorni e titolato in unità emoagglutinanti (HAU). Il virus della Stomatite Vesicolare (VSV), è stato prodotto su fibroblasti di topo (L<sub>929</sub>) e sulle stesse cellule titolato per placche.

**Titolazione dell'interferone.** - Le titolazioni di IFN venivano effettuate tramite il test della riduzione del 50% delle placche da VSV su UAC e con la riduzione dell'effetto citopatico (c.p.e.) del VSV su UAC o su fibroblasti umani in sistema microtitolo. Le titolazioni di IFN sono state eseguite contro uno standard di laboratorio calibrato sullo standard per l'IFN  $\beta$  umano dell'N.I.H., codice 4023-902-527. I titoli di interferone sono riportati come Unità Internazionali (IU).

**Purificazione dell'interferone.** - L'interferone, concentrato su membrana Amicon PM 10, portato a 1 M NaCl, veniva passato su colonna (9 x 0,5 cm) di Blue Sepharose (Pharmacia). La colonna veniva lavata con tampone E<sub>1</sub>: 0,02 M tampone fosfato, pH 7,4, 1 M NaCl. L'IFN legato alla resina veniva eluito con tampone E<sub>2</sub>: 0,02 M tampone fosfato, pH 7,4, 1 M NaCl, 50% Glicole etilenico.

**Preparazione dell'RNA e traduzione in vitro.** - L'RNA era estratto con la tecnica della Guanidina-HCl (10) e l'RNA poly A+ veniva preparato, per mezzo di cromatografia su oligo (dT) cellulosa. L'RNA così otte-

nuto, precipitato con K-acetato per rimuovere tracce di detergenti e impurezze, veniva tradotto nel sistema acellulato dei reticolociti di coniglio (New England Nuclear). I lisati di reticolociti, conservati in azoto liquido, venivano ricostituiti al momento dell'uso e, dopo l'aggiunta del poly A+, incubati 1 h a 37° C. La sintesi proteica totale veniva valutata per incorporazione di Met-S<sup>35</sup> in materiale acido-precipitabile, mentre la presenza di interferone veniva valutata saggiando l'attività antivirale del materiale tradotto su fibroblasti umani in microtiter.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE.

Al fine di definire le migliori condizioni di produzione di IFN da cellule UAC, virus della malattia di Newcastle (NDV) e virus Sendai sono stati aggiunti a colture di cellule densamente confluenti nelle condizioni indicate nella Tab. 1. Dopo 1 h di adsorbimento, l'inoculo virale veniva rimosso e MEM + 2% NCS veniva aggiunto alle colture. In alcuni esperimenti, dopo la rimozione dell'inoculo virale, le cellule venivano addizionate con MEM senza siero, senza che questo influisse sulla resa di IFN.

Tabella 1. - Produzione di IFN da cellule UAC.

TRATTAMENTO	Dosi degli induttori	Titoli di IFN ottenuti IU/ml
Virus della malattia di Newcastle (NDV), 1 h	100 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	10.000
	10 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	100.000
	5 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	80.000
	1 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	40.000
Virus Sendai, 1 h ....	5120 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	1.000
	512 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	1.000
	51 HAU/10 <sup>6</sup> cellule	1.000
Poly I:C ..... + Cicloeximide ..... + Actinomicina D (vedi testo) .....	50 µ/ml	} 25.000
	10 µ/ml	
	1 µ/ml	

Esperimenti condotti sulla cinetica di produzione hanno dimostrato che la massima produzione di IFN dalle UAC si ottiene 16-20 h dopo l'induzione. Il soprannatante delle colture così indotte veniva raccolto, centrifugato per eliminare i detriti cellulari, portato a pH 2 con HCl 6 N, mantenuto 5 giorni a 4° C e quindi, dopo essere stato neutralizzato con NaOH, conservato a -70° C. Nel caso di esperimenti di «superinduzione», l'induzione veniva effettuata aggiungendo 50 µg/ml di poly I:C + 10 µg/ml di cicloeximide. Dopo 4 h veniva aggiunta actinomicina D (1 µg/ml), le colture venivano lavate 2 h dopo e addizionate con MEM + 2% NCS.

Come si può notare nella Tab. 1, sia il virus Sendai che la superinduzione con poly I:C sono capaci di in-

durare la produzione di IFN nelle cellule UAC, ma i livelli più alti (100.000 IU/ml) si ottengono con l'induzione con NDV. In esperimenti in cui le cellule indotte sono state tripsinizzate e contate si è osservato, che la produzione di IFN è di 100-150 IU/10<sup>6</sup> cellule. In questo sistema la quantità di IFN prodotto non aumenta utilizzando sostanze quali Butirato e Teofilina, che in alcune linee cellulari murine e umane [6-8] sono capaci di aumentare da 5 a 50 volte la produzione di IFN.

Per caratterizzare l'IFN prodotto dalle cellule UAC, abbiamo titolato l'attività antivirale sia su fibroblasti umani, che su cellule bovine. È noto, infatti, che l'IFN α, diversamente dal β, esplica attività antivirale anche su cellule bovine, oltre che su cellule umane. I dati ottenuti, l'effetto antivirale maggiore sulle cellule umane (516 IU/ml) che non su quelle bovine (8 IU/ml), suggeriscono che l'interferone prodotto dalle cellule UAC è di tipo prevalentemente β. Questo è stato confermato da esperimenti di neutralizzazione dell'attività antivirale dell'IFN di UAC con antisieri anti α- e anti β-IFN umano: 2.000 unità di IFN da UAC, infatti, sono state completamente neutralizzate da un antisiero anti β-IFN umano, mentre l'antisiero anti α-IFN non ha bloccato l'attività dell'IFN da UAC.

L'IFN β così prodotto è stato purificato con la tecnica della cromatografia su Blue-Sepharose, secondo Knight [5, 9]. L'affinità dell'IFN β per il Blue-Sepharose è dovuta all'alta idrofobicità di questa proteina che ne permette il legame alla resina anche ad alta concentrazione salina (1 M NaCl) mentre le altre proteine presenti, che non si legano, vengono eluite. L'IFN da UAC, concentrato 20 volte su una membrana Amicon PM-10, portato alla concentrazione di 1 M NaCl, è stato passato su una colonna (0,5 × 9 cm) di Blue-Sepharose. Dopo un lavaggio con 200 ml di Buffer E<sub>1</sub>, per allontanare le proteine non legate, l'IFN viene

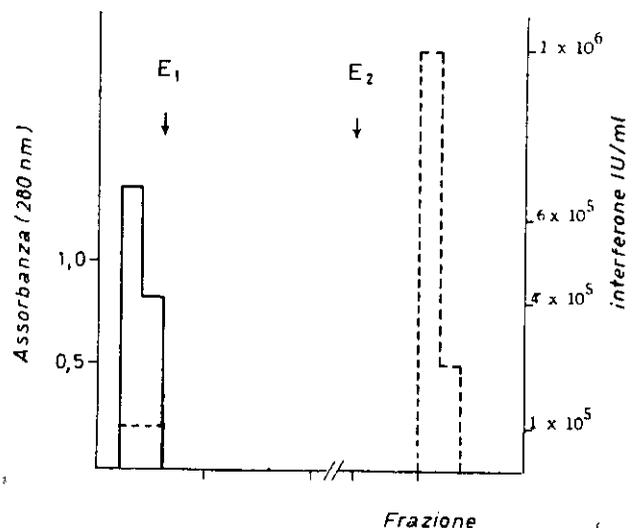


Fig. 1. - Cromatografia di interferone fibroblastico umano su Blue Sepharose. 10 ml di Hu-β-IFN con un titolo di  $2 \times 10^6$  IU/ml, portati a 1M NaCl sono passati su colonna (9 × 0,5 cm) di Blue Sepharose (Pharmacia) a temperatura ambiente. La colonna è stata quindi lavata con 200 ml di tampone E<sub>1</sub>: 0,02 M tampone fosfato, 1M NaCl. L'interferone legato alla colonna è stato eluito con tampone E<sub>2</sub>: 0,02 M NaCl, 1M NaCl, 50% etilene glicole. Le frecce indicano il momento di applicazione dei tamponi alla colonna. Titoli di interferone (---); concentrazione proteica (—)

eluito dalla colonna con un tampone (Buffer E<sub>2</sub>) con 50% di glicole etilenico. Con un solo passaggio di questo tipo si ottiene una purificazione di 600 volte, passando da un'attività specifica di 10<sup>4</sup> IU/mg di proteina, ad una di 0,6·10<sup>7</sup>/mg di proteine.

L'ultimo aspetto da noi studiato riguarda l'espressione dell'RNA messaggero dell'IFN. Dati gli alti livelli di produzione, ci si aspettava infatti un alto livello del relativo mRNA. L'RNA totale è stato estratto dalle UAC, coltivate in bottiglie rotanti, dopo 9 h di induzione con NDV, secondo la tecnica della Guanidina-HCl [10]. L'RNA totale è stato, quindi, passato su colonna di oligo(dT)-cellulosa e l'RNA poly A+ ottenuto è stato tradotto *in vitro* per verificare la presenza di molecole codificanti per l'IFN  $\beta$  umano. La traduzione è stata effettuata per mezzo di microiniezione

in oociti di *Xenopus Laevis* e in lisati di reticolociti di coniglio, ottenuti dalla New England Nuclear. Sia il sopranatante degli oociti che i lisati di reticolociti sono stati, quindi, diluiti e saggiati in microtiter assay, per verificare la presenza dell'attività antivirale indotta in fibroblasti umani.

I risultati ottenuti con i lisati di reticolociti di coniglio danno una media di 300-600 IU di IFN per ml, da 3 a 6 volte maggiore di quanto ottenuto con RNA estratto da fibroblasti, suggerendo così un'elevata espressione del gene dell'IFN  $\beta$  umano nelle cellule UAC. In conclusione, quest'ultimo risultato ed i dati riportati sull'alta produzione di IFN, insieme al breve tempo di duplicazione ed alla relativa efficienza di coltura, fanno di queste cellule un sistema utile ed efficiente per lo studio dell'IFN  $\beta$  umano.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ISAACS, A. & LINDENMANN, J. 1957. Virus interference. The interferon. *Proc. Royal Society B.* **147**: 258-267.
2. TAIRA, H., BROEZE, R. J., SLATTERY, E. & LENGYEL, P. 1980. Large scale production of mouse interferons from monolayers of Ehrlich Ascites Tumour cells. *J. Gen. Virol.* **49**: 231-234.
3. FUJISAWA, J. & KAWADE, Y. 1981. Properties of nonglycosylated and glycosidase-treated mouse L cell interferon species. *Virology.* **112**: 480-487.
4. HEINE, J. W., VAN DAMME, J., DE LEY, M., BILLIAU, A. & DE SOMMER, P. 1981. Affinity chromatography of human fibroblast interferon by Zinc chelate chromatography. *J. Gen. Virol.* **54**: 47-56.
5. FERREIRA, P., C. P., PAUCKER, M., GOLGHER, R., R. & PAUCKER, K. 1981. Affinity chromatography of primary human amnion interferon. *Arch. Virology.* **68**: 27-33.
6. ADOLF, G., R. & SWETLY, P. 1979. Interferon production by human lymphoblastoid cells is stimulated by inducers of Friend cells differentiation. *Virology.* **99**: 158-166.
7. SLATTERY, E., TAIRA, H., BROEZE, R. & LENGYEL, P. 1980. Mouse interferons: production by Ehrlich Ascites Tumour cells infected with Newcastle Disease. Virus and its enhancement by Theophylline. *J. Gen. Virol.* **49**: 91-96.
8. MORSE, J., MEAGER, A. & COLMAN, A. 1980. Enhancement of interferon mRNA levels in butyric acid-treated Namalva cells. *FEBS Lett.* **112**: 203-204.
9. KNIGHT, E. & FAHEY, D. 1981. Human fibroblast interferon: an improved purification. *J. Biol. Chem.* **252**: 5934-5935.
10. RAJ, N., B., K. & PITHA, P., M. 1980. Synthesis of new protein associated with induction of IFN in human fibroblast cells. *Proc. Natl. Sci. (U.S.A.)*. **77**: 4918-4922.

## Modulazione del differenziamento eritroide indotto da DMSO in cellule di Friend trattate con interferone: analisi clonale

ELISABETTA AFFABRIS (a), CRISTINA JEMMA (a), MAURIZIO FEDERICO (a) e GIOVANNI BATTISTA ROSSI (b)

(a) Gruppo di Microbiologia e Patologia Generale, Università degli Studi, Roma;

(b) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - *L'analisi clonale del differenziamento eritroide delle cellule eritroleucemiche di Friend in presenza di DMSO e dosi variabili di interferone (IFN) murino fibroblastico evidenzia che: 1) la stimolazione del differenziamento eritroide indotta da basse dosi di IFN è mediata da una semplice accelerazione del processo differenziativo; 2) nella inibizione del differenziamento eritroide determinata da alte dosi è possibile individuare un effetto dell'IFN a livello della traduzione e uno, più precoce, a livello del commitment eritroide.*

**Summary** (Clonal Analysis of the Modulation of DMSO-induced Erythroid Differentiation in Interferon-treated Friend Leukemia Cells). - *Clonal analysis of DMSO-induced erythroid differentiation of Friend cells was carried out in the presence of different interferon (IFN) dosages: 1) the enhancement of erythroid differentiation induced by treatment with low doses of IFN is mediated by acceleration of the differentiation events; 2) treatment with high doses of IFN inhibits erythroid differentiation both early (at the level of commitment) and late (at the translation level).*

Le linee cellulari eritroleucemiche di Friend sono costituite da proeritroblasti murini infettati cronicamente dal complesso virale di Friend ed incapaci di ulteriore maturazione eritroide. Esse sono state stabilizzate *in vitro* a partire da tumori trapiantabili originati da impianti di tessuti splenici o epatici, provenienti da topi leucemici inoculati con il virus di Friend [1, 2]. La natura eritroide delle cellule può essere messa in evidenza *in vitro* e *in vivo*. In particolare, si può ottenere differenziamento eritroide terminale trattando le colture con alcune sostanze, spesso non chimicamente correlate, quali dimetilsolfossido (DMSO), emina, acidi grassi a catena corta, diammine, purine e loro analoghi. Si osserva allora trascrizione di nuovi mRNA, tra cui predominante è quello della globina, con successiva produzione di emoglobina e marcatori caratteristici delle cellule eritroidi. Per una rassegna sulle cellule di Friend vedere [3-5]. Il sistema delle cellule eritroleucemiche di Friend (FLC) è stato utilizzato per studiare gli effetti indotti da preparazioni di interferone (IFN) murino fibroblastico, che, come è noto, è una miscela di IFN  $\alpha$  e  $\beta$ .

Il lavoro svolto in passato ha messo in evidenza che l'interferone è in grado di modulare il differenziamento

eritroide indotto da DMSO [6-10], oltre ad esercitare una attività antivirale, che si manifesta con una inibizione completa e reversibile della produzione del virus di Friend [8, 11]. Basse dosi di IFN (15-300 U/ml) determinano una leggera stimolazione dose-dipendente del differenziamento, alte dosi ( $> 1.000$  U/ml) determinano inibizione, dosi intermedie tra le due non producono variazioni. L'azione sul virus è sempre di tipo inibitorio. Inoltre, quanto osservato con preparazioni di IFN a differente purezza è stato confermato con preparazioni pure (att. spec.  $10^9$  U/mg proteina), fornite dal Dr. I. Gresser (Institut des Recherches sur le Cancer, Villejuif, Francia) [12].

Da un'analisi a livello molecolare condotta in precedenza [10], è stato determinato che nelle cellule trattate con DMSO ed alte dosi di IFN, l'mRNA della globina è ridotto da 2 a 5 volte, mentre la sua sequenza, grandezza e capacità di agire come stampo in sistemi acellulari di sintesi proteica sembra del tutto paragonabile a quella dei controlli. Inoltre si osserva un rapporto invertito, rispetto alle cellule trattate solo con DMSO, tra la quantità di mRNA della globina libero nel citosol e quello associato ai polisomi (2:1 invece di 1:3) [12].

La rimozione del DMSO e dell'IFN dal terreno di coltura determina il rapido differenziamento delle colture. Infatti, la percentuale di cellule colorate con benzidina (cellule B+, cioè che contengono emoglobina) risale dal 5-10% a circa il 40% in 24-48 ore. Questa rapida emoglobinizzazione della coltura si osserva, ma in minor misura, anche aggiungendo  $\alpha$ -amanitina (8  $\mu$ g/ml) nel terreno di coltura, cioè inibendo ogni neosintesi di mRNA [13]. Ciò indica che l'mRNA della globina, trascritto in quantità da 2 a 5 volte inferiori, viene tradotto se l'agente inibitorio viene rimosso. In queste condizioni, lavando e riseminando le cellule in presenza di  $\alpha$ -amanitina si osserva che il rapporto tra mRNA della globina libero e quello legato ai polisomi tende a ritornare verso i valori del controllo. Questo suggerisce che l'inibizione del differenziamento eritroide, indotta da alte dosi di IFN, è mediata sia dalla ridotta quantità di mRNA della globina prodotto, che da un effetto post-trascrizionale, quale la ridotta percentuale di mRNA associato ai polisomi [12].

Recentemente abbiamo sviluppato i seguenti approcci per analizzare meglio il fenomeno osservato: 1) valutazione dell'intervento dell'IFN sul *commitment* eritroide determinato dall'induttore e 2) isolamento e ana-

lisi di cloni di FLC resistenti all'IFN. Per *commitment* intendiamo quell'evento (o eventi) innescato dall'induttore, che porta, attraverso trascrizione e traduzione di nuovi mRNA e successiva inibizione della capacità moltiplicativa, all'espressione del fenotipo differenziato.

Per quanto riguarda il primo approccio (vedi Tab. 1), cellule di Friend, clone 745A, sono state trattate per 43 ore con DMSO e dosi variabili di IFN, quindi lavate e riseminate in assenza di DMSO e IFN in terreno contenente 0,33 % agar. La colorazione con benzidina effettuata direttamente sulla piastra di coltura, 3 giorni dopo il piastramento in agar soffice, permette di classificare le colonie, sviluppatasi in 3 giorni, in bianche, miste o blu. La colonia bianca è un clone derivato da una cellula *non-committed*, la colonia mista deriva invece da una cellula che perfeziona il proprio *commitment* in agar, la colonia blu è la progenie di una cellula già *committed*. Nella Tab. 1 è riportata la percentuale di cellule B+ di colture parallele, non utilizzate per il piastramento in agar, esaminate 4 giorni dopo la semina per controllare l'effetto dell'IFN. Il trattamento con basse dosi di IFN non sembra modificare la percentuale di cellule *committed* (colonie miste + blu), ma accelera solamente il processo differenziativo. Infatti, si osserva un incremento nella percentuale delle colonie blu a danno delle miste. Nel caso, invece, dell'inibizione del differenziamento indotto da alte dosi, si osserva una diminuzione di cellule *committed* nella popolazione, con ovvio incremento delle colonie bianche. Ciò indica che le alte dosi di IFN agiscono a livello precoce, e cioè sul *commitment* stesso. Si può perciò concludere che la riduzione dei

Tabella 1. - Impegno differenziativo (= *Commitment*) eritroide delle FLC: influenza dell'IFN.

TRATTAMENTO (43 ore)	% di colonie				% di cellule B+ in col- ture cellulari liquide al 4° giorno
	Bianche	Blu	Miste	Blu + miste	
Nessuno .....	92,0	2,4	5,6	8,0	1
DMSO 1,2 % ..	39,0	38,0	23,0	61,0	24
DMSO 1,2 % + IFN 125 U/ml	39,0	48,0	13,0	61,0	40
DMSO 1,2 % + IFN 250 U/ml	36,0	57,0	7,0	64,0	47
DMSO 1,5 % ..	21,6	64,0	14,4	78,4	72
DMSO 1,5 % + IFN 12.000 U/ ml .....	71,0	20,0	9,0	29,0	38
DMSO 1,5 % + IFN 24.000 U/ ml .....	79,0	16,8	4,2	21,0	33

10<sup>6</sup>/ml FLC, seminate ± DMSO e/o IFN alle dosi indicate venivano accuratamente lavate dopo 43 ore e piastrate in 0,5 ml di Dulbecco 20 % siero fetale di vitello e 0,33 % bactoagar su di un supporto nutritivo di 2 ml costituito da Dulbecco 15 % siero fetale di vitello e 0,5 % bactoagar. Dopo 3 giorni di crescita (37°C in atmosfera umidificata contenente 5 % CO<sub>2</sub>), le colonie venivano colorate aggiungendo qualche goccia di una soluzione 1 % benzidina diclorata in 3 % acido acetico glaciale.

Colture cellulari liquide, allestite parallelamente, sono state utilizzate dopo 96 ore di crescita, per ottenere il % di cellule B+ in coltura liquida.

livelli di mRNA della globina, osservata in saggi di ibridazione liquida, non è dovuta ad un effetto sulla trascrizione *per se*, ma piuttosto ad un effetto dell'IFN a monte della stessa e cioè sul *commitment*.

Per quanto riguarda il secondo approccio, recentemente abbiamo isolato alcuni cloni IFN-resistenti delle FLC. L'isolamento è stato ottenuto per clonaggio in agar di una popolazione cellulare (clone 745A) selezionata mediante crescita continua in presenza di IFN per circa 10<sup>7</sup> divisioni cellulari. I cloni isolati sono resistenti all'azione antivirale esercitata dall'IFN. Infatti, mentre il pretrattamento per 20 ore con 200 U/ml di IFN delle cellule di tipo selvaggio (745A) porta ad una inibizione di 2-3 logaritmi nella produzione virale a seguito di infezione con virus Mengo o virus della stomatite vescicolare (VSV), nessuna attività antivirale è rilevabile nei cloni resistenti [14].

Abbiamo esaminato la modulazione del differenziamento eritroide, determinata dall'IFN, in un clone resistente. Esperimenti preliminari indicano che l'aumento del differenziamento eritroide indotto da DMSO, ottenuto trattando le cellule di controllo con dosi basse di IFN non si osserva nelle cellule resistenti. Invece il trattamento con alte dosi di IFN determina una inibizione dose-dipendente della crescita cellulare e del differenziamento eritroide sia nelle cellule di controllo che in quelle resistenti [14]. Per controllo sono stati paragonati, nello stesso esperimento, lo stato antivirale e la percentuale di differenziamento eritroide nelle cellule resistenti trattate con dosi crescenti di IFN. La riduzione della percentuale di cellule B+ si manifesta con dosi di IFN (9.000 U/ml), che non determinano variazioni nella capacità moltiplicativa del VSV. Poiché la specificità dell'effetto dell'IFN è stata dimostrata adoperando preparazioni di IFN puro [12], si può concludere che la capacità dell'IFN di inibire il differenziamento eritroide sembra mediata da meccanismi differenti da quelli che portano alla espressione dello stato antivirale e all'accelerazione del differenziamento. Infatti questi ultimi effetti sono aboliti entrambi nel clone IFN-resistente esaminato, mentre l'effetto delle alte dosi persiste.

I risultati dell'analisi clonale del differenziamento eritroide in presenza di IFN, in aggiunta ai dati precedentemente pubblicati, permettono di tentare una analisi più avanzata dei meccanismi che regolano le interazioni, a livelli diversi di dose, dell'IFN con le FLC. In particolare, nel caso dell'inibizione del differenziamento è evidente che esso si realizza a due livelli: uno alto, o precoce, sul *commitment* delle FLC stimolate a differenziare dal DMSO, ed un secondo a livello della traduzione del messaggero della globina. La valutazione congiunta dei dati sulla reversibilità dell'effetto di IFN e di quelli, qui riportati, dell'analisi clonale dello stesso, permettono di proporre che il sito o livello d'azione dell'IFN sul *commitment* eritroide è posteriore o a valle di quello del DMSO. Infatti, negli esperimenti in cui l'IFN (alte dosi) inibisce il differenziamento indotto dal DMSO, la rimozione di entrambi, dopo 3 giorni di coltura, determina un rapido aumento della percentuale di cellule B+. Questa emoglobinizzazione si osserva, in minor misura, anche se si aggiunge  $\alpha$ -amanitina dopo la rimozione del DMSO e dell'IFN, cioè se si inibisce la neosintesi di mRNA. La percentuale di cellule B+, che si osserva in queste colture contenenti  $\alpha$ -amanitina, 24 ore dopo la rimo-

zione di DMSO e IFN, è simile a quella delle colonie blu (vedi Tab. 1), sviluppate dopo il pretrattamento per 43 ore con DMSO e alte dosi di IFN. Ciò indica che, di tutte le cellule che erano state bloccate nel processo differenziativo, diventano emoglobinizzate solo quelle che erano sfuggite ad un effetto precoce sul *com-*

*mitment* e cioè che già contenevano mRNA della globina. La maggiore percentuale di B+ osservata in colture parallele, prive di  $\alpha$ -amanitina, indica che alcune cellule, bloccate dall'IFN, hanno invece bisogno di trascrivere per produrre emoglobina, ma non hanno più bisogno della presenza dell'induttore (DMSO).

#### BIBLIOGRAFIA

1. FRIEND, C. & HADDAD, J. 1960. Tumor formation with trasplants of spleen or liver from mice with virus-induced leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* **25**: 1279-1285.
2. FRIEND, C., PATULEIA, M. C. & DE HARVEN, E. 1966. Erythrocytic maturation *in vitro* of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Nat. Cancer Inst. Mono.* **22**: 505-514.
3. TRONLER, D. H., RUSCETTI, S. K. & SCOLNICK, E. M. 1980. The molecular biology of Friend virus. *BB-A Rev. Cancer.* **605**(3): 305-324.
4. REUBEN, R. C., RIFKIND, R. A. & MARKS, P. A. 1980. Chemically induced murine erythroleukemic differentiation. *BB-A Rev. Cancer.* **605**(3): 325-346.
5. ROSSI, G. B., AFFABRIS, E., BELARDELLI, F., PULCIANI, S., TITTI, F., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R. & PESCHLE, C. 1981. Possibile ruolo del genoma virale nel controllo del differenziamento eritroide delle cellule eritroleucemiche di Friend. In: *Virus oncogeni ad RNA*. C. De Giulì Morghen (Ed.). Piccin Editore, Padova, pp. 331-349.
6. LIEBERMAN, D., VOLLOCH, Z., AVIV, H., NUDEE, V. & REVEL, M. 1975. Effects of interferon on hemoglobin synthesis and leukemia virus production in Friend cells. *Mol. Biol. Rep.* **1**: 447-451.
7. LUFTIG, R. B., CONSCIENCE, J. F., SKOULTCH, A., MC MILLAN, P., REVEL, M. & RUDDLE, F. H. 1977. Effect of interferon on dimethyl sulfoxide-stimulated Friend erythroleukemic cells: ultrastructural and biochemical study. *J. Virol.* **23**: 799-810.
8. DOLEI, A., COLLETTA, G., CAPOBIANCHI, M. R., ROSSI, G. B. & VECCHIO, G. 1980. Interferon effects on Friend erythroleukemia cells. I) Expression of virus and erythroid markers in untreated and dimethyl sulfoxide-treated cells. *J. Gen. Virol.* **46**: 227-236.
9. ROSSI, G. B., MATARESE, G. P., GRAPPELLI, C. & BELARDELLI, F. 1977. Interferon inhibits DMSO-induced erythroid differentiation of FLC. *Nature.* **267**: 50-52.
10. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CIOÈ, L., BENEDETTO, A., MATARESE, G. P. & BELARDELLI, F. 1977. Inhibition of transcription and translation of globin messenger RNA in dimethyl sulfoxide-stimulated Friend erythroleukemic cells treated with interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **74**: 2036-2040.
11. RAMONI, C., ROSSI, G. B., MATARESE, G. P. & DOLEI, A. 1977. Production of Friend leukemia virus antigens in chronically-infected cells treated with interferon. *J. Gen. Virol.* **37**: 285-296.
12. ROSSI, G. B., DOLEI, A., CAPOBIANCHI, M. R., PESCHLE, C. & AFFABRIS, E. 1980. Interactions of interferon with *in vitro* model systems involved in hematopoietic cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **350**: 279-293.
13. CIOÈ, L., DOLEI, A., ROSSI, G. B., BELARDELLI, F., AFFABRIS, E., GAMBARI, R. & FANTONI, A. 1978. Potential for differentiation, virus production and tumorigenicity in murine erythroleukemic cells treated with interferon. In: *In vitro aspects of erythropoiesis*. M. J. Murphy (Ed.). Springer Verlag, New York, pp. 159-171.
14. AFFABRIS, E., JEMMA, C. & ROSSI, G. B. 1982. Isolation of interferon-resistant variants of Friend erythroleukemia cells: effects of interferon and ouabain. *Virology.* **120**: 441-452.