

Inhibition of EMC Virus Reproduction and Prevention of Cell Death by Amino Acid Analogues and Puromycin

Structural analogues of amino acids are often used as regulation factors of viral reproduction and of synthesis of viral proteins and nucleic acids¹⁻⁴. The antiviral (chemotherapeutic) value of a drug may be revealed as its capacity to prevent the death of a virus-infected cell⁵. The cause of virus-induced cell death is of special interest. According to TAMM et al.^{6,7} cell death depends on the synthesis of structural viral protein.

The present study concerns the interrelationships between the antiviral action of some inhibitors of protein synthesis and their capacity to prevent cell death. We used L-ethionine, β -2-DL-thienylalanine and puromycin. The action of the inhibitors was studied in L cells infected with encephalomyocarditis (EMC) virus. The cells in monolayer cultures were infected with 50 TCD₅₀/cell. Earle's solution with 2 μ M of L-glutamine was used as maintenance medium. At different time intervals after infection, cells were stained with trypan blue at a final concentration of 0.1% and the % of dead cells was determined. Accumulation of hemagglutinin in the cells and in the culture fluid was registered as described by MARTIN et al.⁸. The maximum hemagglutinin accumulation in the cells was observed 5.0-5.25 h after infection. 10 h after infection 100% of the cells were dead. At that time the bulk of the virus was in the culture fluid, where hemagglutinin titre was about 1024 HA/0.5 ml ($2 \cdot 10^{-3}$ HA/cell).

In our experiments hemagglutinin formation could be suppressed with all 3 inhibitors used. In experiments with L-ethionine, the formation of hemagglutinin was completely inhibited at a concentration of $1.85 \cdot 10^{-2}$ M. Yet even higher concentrations did not prevent cell death (Table I). Thienylalanine produced a complete inhibition of hemagglutinin formation at a concentration of $4.7 \cdot 10^{-3}$ M, yet the protective effect at that concentration was negligible. Double concentration ($9.4 \cdot 10^{-3}$ M) prevented the death of 50% of the infected cells (Figure 1). The use of puromycin allowed the suppression of the formation of hemagglutinin with a concentration of $3 \cdot 10^{-5}$ M. This concentration suppressed both viral reproduction and cell death. Smaller concentrations allowed the formation of a considerable amount of hemagglutinin but had a partial protective effect (Figure 2). This phenomenon was never observed in our experiments with ethionine and thienylalanine. So in this respect the action of small concentrations of puromycin differs from the effect of amino acid analogues.

Large doses of puromycin ($1.5 \cdot 10^{-4}$ M) suppressed hemagglutinin even if added 3 h after infection, yet cell death was not prevented. Addition of the drug 1 h after infection produced both inhibition of hemagglutinin formation and complete protective effect (Figure 3).

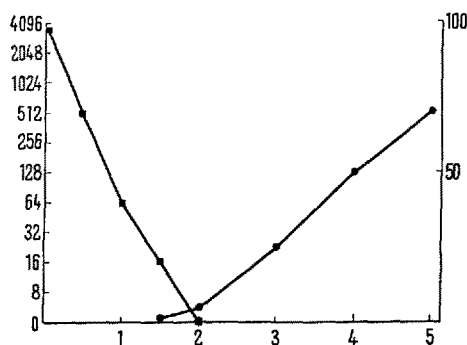


Fig. 1. Effect of DL-thienylalanine on HA-accumulation and cell death in EMC-virus infected L cells. Left ordinate = HA/10⁶ cells 18 h after infection. Right ordinate = % of live cells 18 h after infection. Abscissae = concentration of the drug: 1, 2, 3, 4, 5 - $2.35 \cdot 10^{-3}$ M; $4.70 \cdot 10^{-3}$ M; $7.05 \cdot 10^{-3}$ M; $9.40 \cdot 10^{-3}$ M; and $1.75 \cdot 10^{-2}$ M respectively.

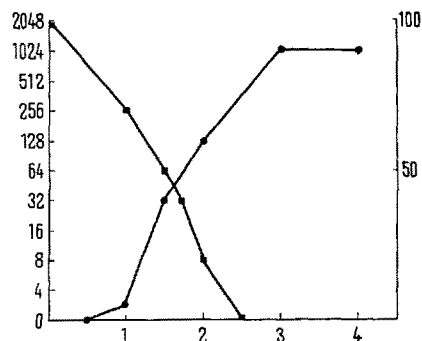


Fig. 2. Effect of puromycin on EMC/HA-accumulation and cell death. 1, 2, 3, 4 - $1.5 \cdot 10^{-5}$ M; $2.25 \cdot 10^{-5}$ M; $3 \cdot 10^{-5}$ M; and $3.75 \cdot 10^{-5}$ M respectively.

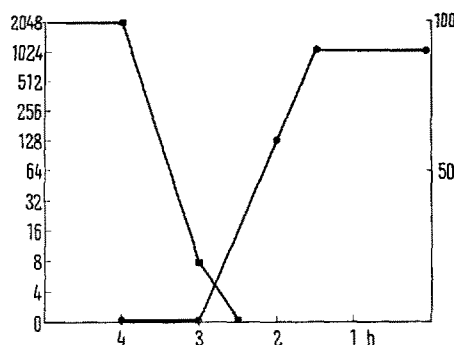


Fig. 3. Cell death and HA-accumulation in the presence of puromycin ($1.5 \cdot 10^{-4}$ M) added at different time intervals. Ordinate = HA concentration. Abscissa = time interval between infection and addition of puromycin.

Inhibition of EMC-hemagglutinin production by L-ethionine

Concentration of L-ethionine	HA/10 ⁶ cells (18 h after infection)
$2.5 \cdot 10^{-2}$ M	4
$1.85 \cdot 10^{-2}$ M	4
$5 \cdot 10^{-3}$ M	32
10^{-3} M	128
0 (control)	1024

¹ S. MOHAJER and J. CABLIKS, J. exp. Med. 123, 17 (1966).

² M. D. SCHARFF, M. M. THORÉN, W. T. McELVAIN, and L. LEVINTOW, Biochem. biophys. Res. Commun. 10, 7, 127 (1963).

³ G. A. GALEGOV and V. M. ZHDANOV, Experientia 22, 61 (1966).

⁴ C. SHOLTISSEK and R. ROTT, Nature, Lond. 206, 729 (1965).

⁵ E. VAMOS, Arch. ges. Virusforsch. 18, 96 (1966).

⁶ R. BABLANIAN, H. J. EGGERS, and J. TAMM, Virology 26, 100 (1965).

⁷ R. BABLANIAN, H. J. EGGERS, and J. TAMM, Virology 26, 114 (1965).

⁸ E. M. MARTIN, J. MALEC, S. SVED, and T. S. WORK, Biochem. J. 80, 585 (1961).

Binomial action of protein synthesis inhibitors – suppression of viral reproduction and of cell death – is characteristic for puromycine and thienylalanine, but not for ethionine. In the case of thienylalanine, these 2 processes are dissociated at a concentration of $4.7 \cdot 10^{-8} M$ (100% cell death without hemagglutinin formation). With puromycine they are partly dissociated at $1.9 \cdot 10^{-8} M$ to $2.3 \cdot 10^{-6} M$ (accumulation of hemagglutinin and partial protective effect).

The degree of binomial action of the inhibitors is correlated with their ability to suppress protein synthesis. Ethionine, a weak inhibitor, suppresses viral reproduction but does not prevent cell death. Thienylalanine, a moderate inhibitor, readily suppresses viral reproduction, and, in larger concentrations, suppresses cell death. Puromycine, a highly effective inhibitor, prevents cell death even at small concentrations which produce only partial suppression of viral reproduction. It may be inferred that the synthesis of the viral factor responsible for cell death is not sensitive to the action of ethionine, is moderately sensitive to thienylalanine and is highly sensitive to puromycine. The latter suppresses the synthesis of the factor

at a concentration which allows formation of considerable amounts of structural viral protein. These facts suggest that the factor, though of a protein nature, is not identical with structural viral protein. The results obtained with thienylalanine and puromycine allow us to assume a selective antiviral action of these inhibitors.

Выводы. L-этионин подавляет репродукцию вируса энцефаломиокардита, но не предотвращает гибели клеток под действием вируса. D, L-β-тиенилаланин кроме подавления вирусной репродукции способен частично защищать клетки от гибели (более, чем на 50%). Пурамицин, подавляя репродукцию вируса, одновременно защищает клетки от гибели. Репродукция вируса более чувствительна к действию ингибиторов синтеза белка, чем процесс гибели клеток под влиянием вирусной инфекции.

G. A. GALEGOV and N. V. KAVERIN

Ivanovski Institute of Virology, Academy of Medical Sciences, Moscow (USSR), August 17, 1966.

Die Veränderungen der Succinodehydrase-Aktivität in Detroit-6 (VA) Zellen, infolge der Infektion mit dem Hepatitis-infectiosa-Virus

In früheren Arbeiten¹⁻⁵ hat einer von uns die Ergebnisse der Isolierung einiger Hepatitis-infectiosa-Virus-Stämme, deren elektronenoptische und immunologische Eigenschaften, Züchtungsmethoden und zytopathogene Wirkung auf in vitro Kulturen von Detroit-6-(D.-6)-(VA) Zelllinien beschrieben. Eine besondere Eigenschaft dieser Zelllinie besteht darin, dass sie eine ausgeprägte SDH-Wirkung besitzt, welche aber ausfällt, wenn die Linie mit H.-infectiosa-Virus infiziert wird. Ausser der Notwendigkeit, dieses Phänomen zu erklären, stellt sich auch das Problem, die Veränderung der SDH-Wirkung zum Zweck der Frühdiagnose der Virusinfektion zu verwenden.

Die Versuche wurden mit D.-6-(VA)-Zellen in 20 Kulturserien auf Objektträger durchgeführt. Nach einer 2tägigen Entwicklung wurde die Hälfte der Kulturen mit 2 ml Virus-Suspension von 10^{-3} infiziert, die andere Hälfte diente als Kontrolle. Die SDH-Aktivität wurde mit NTC (NBCo), nach RUTENBURG et al.⁶ nachgewiesen. Die ersten Beobachtungen, die 3-4 Tage nach der Infizierung gemacht wurden, haben erwiesen, dass die Virusinfektion auf die SDH-Aktivität eine starke hemmende Wirkung ausübt (Tabelle). Nach 3 Tagen blieb die Aktivität des Enzyms praktisch aus. Nur in zwei Fällen konnte man eine SDH-Aktivität beobachten (Versuch Nr. 13 und 16), was sich wahrscheinlich durch eine abgeschwächte Infektionsfähigkeit der in diesen Fällen angewandten Viren erklären lässt. Die beiden negativen Fälle in den Kontrollkulturen (Versuch Nr. 14 und 17), werden diesem toxischen Einfluss zugeschrieben, welcher wahrscheinlich mit der Qualität des Objektträgers zusammenhängt, da diese Zellen auch die Merkmale einer zytotoxischen Veränderung aufwiesen.

Da das Ausbleiben der SDH-Aktivität 3-4 Tage nach der Infizierung der Zellen keine Erklärung über die

Ursachen und den Mechanismus dieses Phänomens liefert, wurde eine neue Reihe von Versuchen durchgeführt, während denen man das Verhalten des Enzyms von 2 zu 2 h beobachtete. Auf diese Art wurden die ersten Anzeichen einer Verminderung der SDH-Aktivität erst nach 48 h

Versuch No.	Kontrollkulturen	Mit Hepatitis-infectiosa-Virus infizierte Kulturen
1	+++	+ (4)
2	++	- (3)
3	++	- (3)
4	++	- (4)
5	++	+ (4)
6	+++	- (4)
7	+++	- (3)
8	+++	- (3)
9	+++	- (3)
10	+++	- (3)
11	+++	- (3)
12	+++	- (3)
13	+++	+ (3)
14	--	- (3)
15	+++	- (3)
16	++	+++ (3)
17	--	- (4)
18	+++	+ (3)
19	++	- (4)
20	++	- (4)

+++ = Sehr ausgeprägte, in den Kulturen gleichmässig verteilte Aktivität; ++ = Ausgeprägte, in den Kulturen gleichmässig verteilte Aktivität; + = Verminderte Aktivität in kleinen und seltenen Herden; +- = Einige isolierte aktive Zellen; - = Keine SDH-Aktivität. Die Zahlen in Klammern geben die Tage an, die seit der Virusinfektion vergangen sind.