B 3115

Rekombináns és természetes humán tumor nekrózis faktor-α (TNF) gén klónozása és módosítása. Rezisztencia-vizsgálatok természetes és mutáns TNF-fel

Doktori dolgozat

Készítette: Mai Antal

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézete

Szeged,1992

TARTALOMJEGYZÉK

Használt jelek és rövidítések

Bevezetés....1.

Irodalmi áttekintés....2.

Célkitűzés....6.

Anyagok és módszerek....7.

Felhasznált plazmidok....21.

Kísérleti rész....22.

A rekombináns humán TNF-∝(rhTNF) gén klónozása prokarióta expressziós vektorba....22.

A rhTNF tisztítása....28.

A rhTNF módosítása....29.

Deléciók....29.

Konverziók az N-terminálison....32.

Fúziós peptidek előállítása....32.

Természetes humán TNF előállítása....39.

Természetes humán TNF módosítása....41.

A 78. aminosav (Arg) deléciója, és a 79. aminosav (Ser) konverziója Thr-ra....42.

17 aminosav deléciója a 66. és 84. aminosavak között....46.

TNF-érzékeny sejtek transzformálása hTNF génnel....48.

TNF-érzékeny sejtek transzformálása módosított TNF génekkel....48.

Eredmények megvitatása....54.

A rhTNF gén klónozása, expressziója E. coliban....54.

A rhTNF módosítása, a muteinek aktivitása....55.

Természetes hTNF klónozása és expressziója HeLa sejtekben....56.

A természetes hTNF módosítása, membránkötött TNF előállítása....57.

Rezisztencia-vizsgálatok L_{929} sejteken....59.

Összefoglalás....61.

Köszönetnyilvánítás....62.

Idézett irodalom....63.

Központi Könyvtára

HASZNÁLT JELEK és RÖVIDÍTÉSEK

APS - ammónium-perszulfát
BCG - bacillus Calmette-Guerin
BSA - marha szérumalbumin
CPG - meghatározott pórusméretű üveggyöngy (controlled pore glass bead)
dATP - dezoxi-riboadenozin-trifoszfát
DMEM - Dulbecco által módosított Eagle-tápoldat
DNS - dezoxiribonukleinsav
DTT - ditiotreitol
E. coli - Escherichia coli
E.-lombik - Erlenmeyer-lombik
Epp.-fuga - Eppendorf-centrifuga
Epp.-cső - Eppendorf-cső
FCS - újszülött borjú savó
GM-CSF - granulocita-monocita kolóniastimuláló faktor
G418 - geneticin
(HindIII) - a klónozás során megszűnt enzim felismerőhely
HIV-I - az AIDS vírusa
hTNF - humán tumor nekrózis faktor-
IFN-α - interferon-α
IFN-ß - interferon-ß
IFN-γ - interferon-γ
IL-1 - interleukin-1
IL-2 - interleukin-2
IL-6 - interleukin-6
IL-8 - interleukin-8
IPTG - izopropil-ß-D-tio-galaktopiranozid
LPS - lipopoliszacharid (endotoxin)
MnSOD mangánnal működő szuperoxid-dizmutáz
NF-kB - sejtmag-faktor
OD - optikai denzitás
ONPG - orto-nitrofenil-ß-D-galaktopiranozid
PAF - trombocita-aktiváló faktor
PAGE - poliakrilamid-gélelektroforézis
P.-csésze - Petri-csésze
PMA - forbol-mirisztát-acetát
PMSF - fenil-metil-szulfonil-fluorid
PVP - polivinil-pirrolidin
rATP - riboadenozin-trifoszfát
rhTNF - rekombináns humán tumor nekrózis faktor-α
SDS - nátrium-dodecil-szulfát
TEMED - tetraetilén-diamin
TNF - tumor nekrózis faktor-α

BEVEZETÉS

Talán nem járunk túl messze az igazságtól, ha azt állítjuk, hogy az emberiség egyik legsúlyosabb, megoldásra váró problémája a daganatos betegségek gyógyítása. Az emberek többségének tudatában a "rák" a halál képét vetíti előre. Sajnos nem teljesen alaptalanul, tekintve a daganatos betegségekben szenvedők magas halálozási arányát.

Éppen ezért számított rendkívül nagy horderejű eseménynek az 1970-es évek elején Lloyd Old és munkatársainak felfedezése. Úgy tűnt, hogy az általuk felfedezett citokinnel, a tumor nekrózis faktorral egycsapásra megoldhatóvá válhat a daganatterápia.

A tumor nekrózis faktor-α (TNF-α , rövidebben: TNF) az emlős szervezet bizonyos sejtjei által termelt tumorsejtpusztító hatású peptidhormon. Emellett fontos szerepet játszik a szervezet vírus-, bakteriális és parazitafertőzések elleni védekezésében is. Sajnos pozitív hatásait olyan mellékhatások kísérik, amelyek túltermelődése esetén végzetes kimenetelűek lehetnek.

A TNF egy igen bonyolult szabályozási rendszer egyik kulcsszereplője: egyrészt eltérő mennyiségeire a különböző sejttípusok reakciója széles skálán mozog, másrészt egész sor gént képes szabályozni. Köztük - önmaga és sok más fehérje termelésén kívül - olyan citokinekét is, amelyekkel szinergizál, és amelyek inducerei lehetnek a TNF-termelésnek, és sok más faktornak is.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A (TNF) biológiai tulajdonságai nagyon hasonlítanak, sok esetben azonosak egy másik citokin, az interleukin-1 tulajdonságaival (35,46,69,83,86,91,113,118,119, 128,146,163). Felfedezésének történetéhez hozzátartozik az az érdekesség is, hogy látszólag ellentmondó biológiai aktivitásai (tumor nekrózis, cachexia) miatt eleinte két fehérjeként (TNF, cachectin) folytak vele kísérletek (23,65), bár tumorellenes hatása már sokkal korábban is ismert volt, anélkül, hogy magát a TNF-t ismerték volna (120). Csak az 1980-as években vált nyilvánvalóvá, hogy a tumorsejtek elpusztításában és a krónikus bakteriális vagy vírusfertőzésben ill. daganatos betegségben szenvedő páciensek fizikai leépülésében (cachexia) ugyanaz a polipeptid játszik fontos szerepet (11,15,17,18,116).

A TNF-t olyan BCG-fertőzött egerek szérumából írták le először, amelyeket endotoxinnal (LPS) kezeltek. Ezek széruma nekrotizált bizonyos tumorsejteket (23).

A TNF termelődését eleinte csak makrofágoknak tulajdonították (11,154). Később kiderült, hogy L-sejtek PMA- (forbolészter) és LPS- (endotoxin) indukció hatására (30), T-sejtek, B-sejtek és NK- (neutral killer) sejtek (40), hízósejtek (58), granulociták (38), vírusindukcióra a máj Kupffer-sejtjei (20) és sok esetben maguk a tumorsejtek is (115) termelik. A TNF inducerei között nemcsak az endotoxin és a forbolészterek (1,13,16,23,30,33,38,65), hanem daganatok (10,157), malária, leishmaniazis (157), Kala-azar, meningococcus-fertőzés (133), vírusok (9,20,55,88), poly I:C (64), különböző antigének (58,102), mitogének (111), nem enzimatikusan glikozolált fehérjék (162), interleukin-2 (111), interferon-α (88), interferon-ß (76), interferon-γ (111) és maga a TNF is (16,78,148) szerepel (autoamplifikáció).
Ugyanakkor más ágensek, mint például a glukokortikoidok (60,61,66), proteinkináz inhibitorok (55), foszfodiészteráz inhibitorok (61) gátolják a TNF-termelést.

Miután a humán TNF génjét a'80-as években izolálták, és klónozták (1,100,109, 110,122,139), lehetővé vált a fehérje (17 kD; 157 aminosav; izoelektromos pontja 5.3) nagyobb mennyiségeinek előállítása, tisztítása és szerkezetének megállapítása.

A TNF három 17 kD polipeptidlánca - mindegyik egy-egy antiparallel ß-szendvicset és diszulfidhidat tartalmaz (75) - trimert alkot. Az alegységek hidrofób részükkel egymás felé fordulva fej-láb illeszkedéssel kapcsolódnak (3,165). Sprang és munkatársai szerint ezek a trimerek újabb dimerekké szerveződnek (147).

Antitumorális hatása miatt (7,47,63,65,101,152) a klónozását követő rövid időn belül sor került klinikai kipróbálására is (8,15,133,149). Többnyire az intratumorális kezelések (7,47) vagy a kombinált terápia interleukin-2-vel ill. interferon-γ -val vezettek biztatóbb eredményekre (8,133). Ezeknél a kezeléseknél sokkal alacsonyabb dózisokra van szükség, mint az intravénás vagy intraperitoneális befecskendezéseknél (63), amikor a TNF igen gyorsan (6-7 perc a keringési féléletideje) inaktiválódik a szervezetben (14, 149). Sajnos a TNF mellékhatásai - a vörösvértestek számának csökkenése, fehérvérsejtek számának növekedése, étvágytalanság, szöveti gyulladások (158), láz, hányás, tachikardia, fáradtság (133,149), légzészavar, a vér káliumszintjének kóros növekedése, a vesetubulusok nekrózisa, vérzések, tüdőgyulladás (105), fizikai leépülés (cachexia) (17,18,115), sokk (17), magas vércukor szint (105,146), agyhártyagyulladás (128) - olyan súlyosak, hogy az alkalmazási lehetőségek igen szűk korlátok közé szorultak annak ellenére, hogy antivirális (65,74,80,104,166) és antiparazitikus hatása is jelentős (125,140).

In vitro a TNF nemcsak toxikus vagy semleges lehet a sejtvonaltól függően, hanem növekedési faktorként is hathat (46,77,86,152).

In vivo stimulálja az angiogenezist (48,49,90), elősegíti a vérképzést - indukálva egy vérképző faktor (137) és a GM-CSF (granulocita-monocita kolónia-stimuláló faktor) termelését (106) - , ill. a vérképzés regenerálódását a citosztatikum kezelések után (141). Az immunválasz szabályozásában is szerepet játszik: stimulálja a T-limfociták proliferációját (168), és a leukociták adhézióját az endotél sejtekhez a gyulladások területén (119,126). Aktiválja az eozinofil sejteket, amik elpusztítják a gyulladást okozó sejteket (140), ill. az endotél sejteket (142), és részt vesznek az extracelluláris mátrix-komponensek lebontásában (73).

Molekuláris szinten a TNF igen széles hatásspektrummal bír. Aktiválja a foszfolipáz A2-t, ami az arachidonsav kaszkád elindításával prosztaglandinok és leukotriének termelődéséhez vezet (20,31,47,79). Indukálja egyes fehérjék foszforilálását (4), a kollagenáz és a proteinkináz C (19,31,89), a trombocita-aktiváló faktor (PAF, gyulladás és endotoxin sokk foszfolipid-mediátora) termelését (21). Növeli a glukózlebontást (68) és -transzportot (26), a plazma glukagonszintjét és az aminosavfelvételt patkány májban (164). Erősíti az immunválaszt a T-sejt-dependens antigénekre (52). Valamilyen mediátoron (vagy mediátorokon)

keresztül előidézi a DNS fragmentációját (134). Gátolja a lipoprotein-lipáz szintézisét, aminek következtében csökken a zsírmobilizáció (12). Csökkenti az inzulinszekréciót, ami a vércukorszint emelkedéséhez vezet (146). Gátolja a kollagénszintézist (10), a fehérjék és lipidek laterális diffúzióját a sejtmembránban (150), és egy mediátoron keresztül az acetil-CoA-karboxiláz és a zsírsavszintetáz aktivitását (121,154).

A TNF részt vesz egy sor gén regulációjában transzkripciós szinten valamilyen mediátoron (vagy mediátorokon) keresztül. Gátolja a zsírmobilizációban résztvevő gének (101,121,154) és a kollagén gén működését (144). Gátolja a vírusreplikációt (166). Aktiválja a kollagenáz és a ß-aktin gént, a c-jun, c-fos, c-myc és jun-B onkogéneket (19,26,91), indukálja egy zinc finger protein (117), egyes növekedési faktorok (21,106,137), az interleukin-1 (34), az interleukin-8 (89) és az interferon-ß2 termelését (80). Az NF-kB (sejtmag-faktor) termelésének indukcióján keresztül (24, 68,72) is részt vesz az immunválasz szabályozásában (25,72,124). Ugyancsak az NF-kB-n keresztül indukálja a HIV-I- (az AIDS vírusa) expressziót (39,118,127) és az interleukin-6 termelését (171). Továbbá más enhancer-elemekre is hatva (137) eddig még nem azonosított géneket is aktivál (89).

A TNF sejtfelszíni TNF-specifikus receptorokhoz kötődik, és az így alkotott komplex váltja ki azt a szignált, ami azután a sejt pusztulásához, szaporodásgátlásához vagy proliferációjához vezet.

Eleinte feltételezték, hogy a TNF-hatás arányos a célsejten lévő receptorok számával (2,5), majd kiderült, hogy ez csak néhány esetben igaz. Ugyanis olyan sejtek is rezisztensek TNF-re, amelyek például több, mint háromszor annyi receptort hordoznak, mint a TNF-érzékenyek (159). Sőt, a TNF-termelő sejteknek is vannak TNF-specifikus receptoraik, amiket azok endotoxin hatására nagyon gyorsan internalizálnak (36), ill. a TNF/receptor komplexet internalizálják, és a sejtek lebontják a TNF-t (71).

A sejtek TNF-érzékenysége befolyásolható. Bizonyos onkogének (HER2, ErbB2, E1 A) expressziója érzékenyíti a NIH3T3 sejteket, egy másik onkogéné (HRAS) rezisztenssé teszi ezeket (29,70). Adenovírus-fertőzés érzékenyíti, a vírus E3 régiójáról átíródó fehérje rezisztenssé teszi a NIH3T3 sejteket (56). PMA (forbol-mirisztát-acetát) csökkenti a sejtek érzékenységét. A proteinkináz C inhibitorai csökkentik, aktivátorai növelik a PMA hatását (2,161). A TNF és/vagy interleukin-1 alacsony dózisokban rezisztenciát vált ki SV80 (60,83,148) HeLa és L132 sejtekben (69). TNF-érzékeny és -rezisztens sejtek fúziója után a heterokarionokban mindig a rezisztencia dominál (112).

In vivo a ciklooxigenáz inhibitorok csökkentik a TNF-okozta szimptómákat (133). Proteinszintézis inhibitorok (cikloheximid, aktinomicin D) érzékenyítik a Balb/c egereket TNF-re, míg TNF és/vagy interleukin-1 alacsony dózisai TNF-rezisztenciát váltanak ki (163).

Bizonyos szinten maga a szervezet is képes védekezni a TNF ellen azáltal, hogy az uromodulinok - ezek valószínűleg a sejtfelszínről lehasadt szolubilis TNF-receptorok (43,129) - a TNF-hez kötődve inaktiválják azt (42,43,44,129,135,153). Bár ez in vivo még nem bizonyított.

Ma még nem tisztázott, hogy a TNF-specifikus receptorok felépítésében hány protein vesz részt, mi a szerepe az egyes fehérjéknek, és mi a különbség az érzékeny és a rezisztens sejtek receptor-felépítésében. Az eddigi adatok alapján legalább két TNF-receptor fehérje típus van (27,45,51,67,68,85,93). A TNF-receptorok ellen készített monoklonális antitestek TNF-hatást mutattak (43,45,169), egy kivételével, ami TNF-antagonista (153). Utóbbi esetében nem tisztázott, hogy a TNF-antagonizmus sztérikus gátlás, konformációváltozás vagy más jellegű folyamat eredménye-e.
Más TNF-receptor fehérjék génjeit mostanában klónozták (57,81,92,132), ami lehetővé teszi részletesebb vizsgálatukat, és közelebb visz bennünket a TNF hatásmechanizmusának felderítéséhez.

CÉLKITŰZÉS

Munkánkat a hTNF-α gén izolálása után (Tóth Miklós, MTA SZBK, Biokémiai Intézete, nem publikát adatok) 1986. végén kezdtük. Célkitűzésünkben az alábbi problémákat kívántuk megoldani, illetve a felmerült kérdésekre választ kapni:

1. Laboratóriumi körülmények között alacsony költséggel, nagy mennyiségű rhTNF-t termeltetni baktériumokkal.

2. Csökkenteni a TNF legsúlyosabb mellékhatásait - azaz növelni a TNF tumor-specificitását - genetikai manipulációk segítségével.

3. Vizsgálni a TNF biológiai aktivitását nem toxikus polipeptidekkel történő fúziója után.

4. TNF-antagonistát előállítani a rhTNF-ből genetikai módosítások útján.

5. A rhTNF-nél hosszabb keringési idejű, de azonos aktivitású muteint előállítani.

6. Megoldani a természetes humán TNF nagy mennyiségben történő termeltetését emlős sejtekkel.

7. Előállítani a TNF membránkötött formáját génmanipulációs módszerekkel.

8. Képesek-e TNF-termelésre TNF-érzékeny (L_{929}) sejtek transzformációval bejuttatott TNF génről?

9. Kiváltható-e TNF-rezisztencia TNF-érzékeny, L_{929} sejtekben TNF gén bevitelével?

10. Kiváltható-e TNF-rezisztencia L_{929} sejtekben mutáns TNF gének bevitelével?

11. Kiváltható-e a TNF-rezisztencia L_{929} sejtekben inaktív TNF-muteint kódoló gének bevitelével, azaz meghatározható-e delécios mutánsok segítségével a TNF-rezisztenciáért felelős TNF-szakasz?

ANYAGOK és MÓDSZEREK

Plazmid-DNS preparálása (130)

Oldatok

LB (per liter): 10 g Bacto-tripton
5 g Bacto-élesztőkivonat
10 g NaCl
pH 7.5
sterilezés autoklávozással

LB_{Ap}: LB + 50 /ml (végkoncentráció) ampicillin

SolI: 50 mM glukóz
25 mM Tris(HCl) pH 8.0
10 mM EDTA
5 mg/ml lizozim-klorid

SolII: 0.2 N NaOH
1.0 % SDS

SolIII: 5.0 M K-acetát pH 4.8

TE: 10 mM Tris(HCl) pH 7.4
1 mM EDTA pH 8.0

Semmelweis Egyetem Központi Könyvtára

Kompetens baktériumok:

Escherichia coli: DH 1, DH 5, JM 119, XL1 Blue

Plazmid szaporítása

A plazmidot hordozó E. coli törzset 10 ml LB-ben 37 °C-on éjszakán át rázattuk, majd a tenyészet 5 ml-ével indítottunk 1 literes kultúrát 37 °C-on éjszakán át rázatva 50µg/ml ampicillin jelenlétében 3 literes E.-lombikban.

Sejtfeltárás, plazmidkinyerés

A tenyészetet 4 °C-on 4000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük. A sejteket 20 ml SolI-ben szuszpendáltuk, és 5 percig szobahőn inkubáltuk, majd 30 ml frissen készített SolII hozzáadása után lassú mozgatással összekevertük, és 10 percig jégfürdőben inkubáltuk. Ezt követően 30 ml jéghideg K-acetáttal lassú mozgatással összekevertük, és 20 percig jégen inkubáltuk. A keletkezett csapadékot 4 °C-on kiülepítettük (10.000 g; 10 perc), a felülúszót 0.6 térfogat izopropanollal összekeverve 20 percig szobahőn inkubáltuk, majd a csapadékot 10.000 g-vel szobahőn lecentrifugáltuk. A felülúszót leöntve a csapadékot 70 %-os etanollal mostuk (10.000 g; 10 perc), majd vákuumban történő szárítás után 1 ml TE-ben oldottuk.

Plazmid tisztítása CsCl grádiensen

A plazmidpreparátumot 0.78 g/ml céziumkloridban 200 µg/ml etidiumbromid jelenlétében TV865 rotorban 42.000 fordulattal 18 °C-on 24 órán át centrifugáltuk, majd a plazmidot UV-fénnyel láthatóvá téve Eppendorf-csövekbe összegyűjtöttük.

Etidiumbromid eltávolítása, DNS fenolozása, kicsapása

A plazmidpreparátumhoz azonos térfogat vízzel telített n-butanolt adtunk, alaposan összeráztuk, és néhány másodpercig centrifugáltuk. A felső - butanol-etidium-

bromid - fázist leszívtuk. A folyamatot addig ismételtük, amíg a butanolos fázis színtelenné vált.

A céziumkloridot TE-vel szembeni dialízissel távolítottuk el, majd a plazmidoldatot vele azonos térfogatú fenol:kloroform 1:1 arányú keverékével (fenol - desztillált, TE-vel telített, kloroform - kloroform:izo-amilalkohol 24:1 arányú keveréke) alaposan összeráztuk, 5 percig centrifugáltuk, a felülúszót új csőbe vittük, és a fenti eljárást megismételtük azonos térfogat kloroformmal.

A felülúszóhoz 0.1 térfogat 3.0 M-os Na-acetátot, majd két térfogat 96 %-os etanolt adtunk, és 20 percig szobahőn állni hagytuk. A DNS-t 10 perces centrifugálással kiülepítettük, 70 %-os etanollal mostuk, majd vakuumban beszárítva felvettük 0.5-1.0 ml TE-ben.

A plazmidtisztítás hatékonyságát 1.0 %-os agarózgélen ellenőriztük.

DNS emésztése restrikciós endonukleázokkal (130)

Emésztő pufferek

	NaCl	Tris(HCl)pH7.5	$MgCl_2$	DTT
10xL:	0 mM	100 mM	100 mM	10 mM
10XM:	500 mM	100 mM	100 mM	10 mM
10XH:	1000 mM	100 mM	100 mM	10 mM

Az enzimeknek megfelelő pufferek kiválasztásához a gyártó cég (New England Biolabs, Amersham, Stratagene, BRC) útmutatásait is figyelembe vettük.

DNS vágása

Eppendorf-csőbe az alábbi anyagokat mértük:

DNS (a kívánt mennyiség TE-ben oldva)
0.1 végtérfogatnyi megfelelő 10X puffer
restrikciós enzim
steril deszt. vízzel kiegészítve a végtérfogatra

Az elegyet 37 °C-on inkubáltuk, majd a hasítást agarózgélen ellenőriztük ismert hosszúságú DNS-fragmentek (DNS-marker) mellett.

DNS-fragment izolálása agaróz gélből

A megfelelő fragmentet tartalmazó agarózcsíkot éles szikével kivágtuk a gélből, TE puffert tartalmazó dializáló hüvelybe helyeztük, majd a gélfuttatáshoz hasonlóan, horizontális tankban a hüvelybe futtattuk a DNS-t; az agarózcsík végénél elvágtuk a dial. hüvelyt, a DNS-t pipettázással felszuszpendáltuk, és Epp.-csőbe vittük. 20-30 percre -20 °C-ra tettük, majd kiolvasztás után 5 percig centrifugáltuk az esetleges agaróztörmelék eltávolítása érdekében. Végül fenoloztuk, kicsaptuk, és szárítottuk.

DNS-vég módosítása (130)

DNS végjelölés α-^{32}P-ATP-vel

10X NTB: 500 mM Tris(HCl) pH 7.2
100 mM $MgSO_4$
1 mM DTT
500 µg/ml BSA (marha szérumalbumin)

Jelölés: 10 µl DNS deszt. vízben oldva
2 µl 2 mM dCTP + dGTP + dTTP
2 µl 10X NTB
1 egység DNS-polimeráz I Klenow fragmentje (Klenow fragment)
20 Ci α-^{32}P ATP
deszt. vízzel 20 µl-re kiegészítve

Fenti elegyet 37 °C-on inkubáltuk 1 órán át, majd TE-vel 100 µl-re kiegészítve fenoloztuk, kicsaptuk, szárítottuk.

DNS tompa vég előállítása

5X MBB: 150 mM Na-acetát
500 mM NaCl
10 mM $ZnCl_2$
50 % glicerin

Feltöltés 5' túlnyúló vég esetén

16µl DNS deszt. vízben oldva
2µl 2 mM dNTP (dCTP+dGTP+dTTP+dATP)
2µl 10X NTB
1 egység Klenow fragment
37 °C; 60 perc inkubálás

Vissszavágás 3' túlnyúló vég esetén

18µl DNS deszt. vízben oldva
2µl 10X NTB
1 egység Klenow fragment
37 °C; 60 perc inkubálás

Visszavágás 5' túlnyúló vég esetén

16µl DNS deszt. vízben oldva
4µl 5X MBB
1 egység Mung-Bean nukleáz
37 °C; 10 perc inkubálás

DNS foszforilálása

10X KB: 0.5 M Tris(HCl) pH 7.6
0.1 M $MgCl_2$
50 mM DTT
1 mM spermidin
1 mM EDTA

Foszforilálás: 50 pmol DNS
10µl 10X KB
50 pmol rATP
20 egység T4 polinukleotid kináz
deszt.vízzel 100µl-re kiegészítve
37 °C; 30 perc inkubálás

DNS ligálás (130)

10X Lig: 500 mM Tris(HCl) pH 7.4
100 mM $MgCl_2$
10 mM spermidin
1 mg/ml BSA

Ligálás: 14µl DNS deszt. vízben oldva
2µl 10X Lig
2µl 10 mM rATP
2µl 100 mM DTT
1 egység T4-DNS-ligáz
12-16 °C; inkubálás éjszakán át

E. coli sejtek transzformálása plazmid-DNS-sel (62)

Kompetens sejt készítés

SOB (per liter): 20 g Bacto-tripton
5 g Bacto-élesztőkivonat
0.5 g NaCl
pH 7.5
autoklávozás
20 ml 1 M $MgSO_4$ (külön autoklávozva)

Fagyasztóoldat: 33 ml 0.1 M $MgCl_2$
7 ml 87 %-os glicerin

Startert készítettünk 10 ml SOB-ben éjszakán át történő rázatással 37 °C-on. 0.5 ml starterrel indítottuk 100 ml SOB-ben a tenyésztést 37 °C-on intenzív rázatással OD_{560}=0.5-ig. A sejteket 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk 4.000 g-vel. A felülúszót leöntve jégen 50 ml 0 C-os 0.1 M $MgCl_2$-ban szuszpendáltuk, 4 °C-on 10 percig 4.000 g-vel centrifugáltuk, 50 ml 0 °C-os 0.1 M $CaCl_2$-ban szuszpendáltuk, 20 percig jégen

inkubáltuk, majd 10 percig 4 °C-on 4.000 g-vel centrifugáltuk. A sejteket felvettük 5 ml 0 °C-os fagyasztóoldatban, és 100µl-enként 0 °C-ra előhűtött Epp.-csövekben -70 °C-on tároltuk felhasználásig.

Transzformálás

A -70 °C-ról kivett kompetens sejteket jégen kiolvasztottuk, hozzáadtuk a DNS-t (kevesebb, mint 500 ng), 2-3 másodpercig vortexeltük, 30 percig jégen inkubáltuk, 2 percig 42 °C-on hősokkoltuk, majd 2-5 percig ismét jégen inkubáltuk. A sejtekre 900 µl LB-t pipettáztunk, 37 C-on rázattuk 60 percig, majd 30-40 másodperces centrifugálás után a felülúszót eltávolítva 40-60µl LB-ben szuszpendáltuk a sejteket, és 2.2 % agartartalmú LB_{Ap} lemezre szélesztve 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk.

Transzformánsok ellenőrzése (130)

Plazmid-miniprep készítése, ellenőrzés enzimes hasítással

A transzformánsokat steril fogpiszkálók segítségével 1.5 ml LB_{Ap} tápoldatba (és LB_{Ap} lemezre) oltottuk. A tenyészeteket éjszakán át 37 °C-on intenzíven rázattuk, majd Epp.-csövekben lecentrifugáltuk (1 perc), és a felülúszót leszívtuk. A sejteket 20µl SOLI-ben szuszpendáltuk, 5 percig szobahőn inkubáltuk, 100-100µl SOLII-t adtunk a mintákhoz óvatosan összekeverve, és jégen 5-10 percig állni hagytuk, majd 100-100µl 5 M K-acetáttal összekeverve 20 percig jégen inkubáltuk, 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, a felülúszót új csövekbe pipettáztuk, fenoloztuk, kicsaptuk, szárítottuk. A csapadékot 10µl 10µg/ml RN-ázt tartalmazó TE-ben feloldottuk, 3-3µl-t a megfelelő enzimmel emésztettünk, és a fragmentméretet agarózgélen ellenőriztük.

In situ DNS-hibridizálás

PHS: 5 ml formamid
1 ml Denhardt's
2.5 ml 20X SSC
1.25 ml Na-foszfát-puffer pH 6.5
0.25 ml denaturált 10 mg/ml csirke DNS

Denhardt's: 20 mg BSA
20 mg fikoll 400
20 mg polivinil-pirrolidin (PVP)
Deszt. vízzel 2 ml-re kiegészítve

20X SSC (per liter): 175.3 g NaCl
88.2 g Na-citrát
pH 7.0

A transzformánsokat párhuzamosan LB_{Ap} lemezekre oltottuk. Az egyik lemezt leoltás előtt steril nitrocellulóz filterrel fedtük. Éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A filtert a tenyészetekkel felfelé 0.5 M NaOH-dal átitatott szűrőpapírra helyeztük 5 percre, majd 5 percre 0.5 M Tris(HCl) pH 8.0 és 1.5 M NaCl-dal átitatott szűrőpapírra. Utóbbit megismételtük. A filtert szobahőn, majd 80 °C-on 2 órán át vákuumban szárítottuk, azután PHS-ben 42 °C-on 2-3 órán át rázattuk buborékmentes, leforrasztott nylontasakban (előhibridizálás). A tasak sarkát levágva belepipettáztuk az α-^{32}P-vel jelölt, 5 perces forralással denaturált (81 bp hosszúságú) DNS-t, a tasakot újra leforrasztottuk, 5-6 órán át 65 °C-on rázattuk, majd 3 x 10 percig 300-300 ml 2x SSC + 0.1 % SDS-sel mostuk 42 °C-on. A filtert szárítás után autoradiografáltuk.

Klónok TNF-termelésének ellenőrzése

Biológiai teszt L_{929} sejteken **(131)**

A restrikciós emésztés alapján megfelelőnek talált klónokat 1-1 ml LB_{Ap}-ben OD_{560}=0.3-ig felnövesztettük, majd 3 mM végkoncentrációjú IPTG-vel (izopropil-ß-D-tio-galaktopiranozid) 20 órán át indukáltuk 37 °C-on. A mintákat ultrahanggal homogenizáltuk, majd 100µl mintát (10µl mérendő anyag + 90µl DMEM + 5 % FCS) 1µg/ml aktinomicin D és 100µg/ml kanamicin jelenlétében 96 lyukú szövettenyész-tő lemezen L_{929} sejtekre ($3X10^4$ sejt/lyuk 100µl DMEM + 5 % FCS-ben) vittük, óvatosan pipettázva összekevertük, 100µl-t a következő lyukba vittünk, és ezt 8 lyukon keresztül megismételtük (felező higítások). Minimum 24 órás inkubálás (37 °C; 5 % CO_2) után mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtlízist. 1 egységnek tekintettük azt a TNF-mennyiséget, amely a 96 lyukú szövettenyésztő lemez egy lyukában

lévő $3x10^4$ sejt 50 %-ának lízisét okozza 1 μg/ml aktinomicin D jelenlétében 24 órás, 37 °C-on történő inkubálás alatt.

Molsúly ellenőrzése SDS-PAGE-n (87)

Stacking gél:

1.67 ml 30 % akrilamid (29:1 akrilamid:bis akrilamid)
2.5 ml 0.5 M Tris(HCl) pH 6.8
5.7 ml deszt. víz
buborékmentesítés vákuummal
300 μl 10 %-os SDS
100 μl 10 %-os APS (ammónium-perszulfát)
10 μl TEMED

Szeparáló gél :

15 ml 30 % akrilamid
7.5 ml 1.5 M Tris(HCl) pH 8.8
7.2 ml deszt. víz
buborékmentesítés vákuummal
300 μl 10 %-os SDS
150 μl 10 %-os APS
15 μl TEMED

TGB: 25 mM Tris(HCl)
192 mM glicin
0.1 % SDS
pH 8.3

SLB: 60 mM Tris(HCl) pH 6.8
2 % SDS
10 % glicerin
0.05 % brómfenolkék
5 % 2-merkapto-etanol

CD (per liter): 455 ml metanol
90 ml 96 % ecetsav
455 ml deszt. víz
2 g Coomassie-kék

DS (per liter): 200 ml metanol
70 ml 96 % ecetsav
730 ml deszt. víz

15 %-os akrilamid gélt készítettünk 5 %-os staking-gel. A minták 40-40 µl-ét lecentrifugáltuk, az üledéket felvettük 20µl SLB-ben, 5 percig forraltuk vízfürdőben, majd felvittük a gélre. A futtatást 200-400 V feszültség mellett végeztük mindaddig, amíg a brómfenolkék a szeparáló gél alsó széléig futott. A gélt CD-vel festettük 20 perces rázatással 50 °C-on, majd differenciáltuk 3-4-szer 500 ml DS-ben 50 °C-on.

ß-galaktozidáz-teszt (130)

ONPG-oldat: (per 100 ml)
400 mg ONPG (o-nitrofenil-ß-D-galakto-piranozid)
100 ml Na-foszfát-puffer (pH7.5)

Az ultrahanggal homogenizált tenyészeteket Epp.-fugában 3 percig centrifugáltuk, majd a minták 50-50µl-éhez 200-200µl ONPG-oldatot adtunk, és néhány percig 30 °C-on inkubáltuk a sárga szín megjelenéséig. A reakciót 500 µl 1 M Na_2CO_3 hozzáadásával állítottuk le. (OD-mérés 420 nm-nél; lineáris 0.2 és 0.8 között)

TNF tisztítása

FB: 10 mM Tris(HCl) pH 7.6
1 mM $MgCl_2$
5 mM merkapto-etanol
0.1 mM EDTA pH 8.0

AB: 10 mM Tris(HCl) pH 7.8
7 mM merkapto-etanol
0.1 mM EDTA pH 8.0

EB: O.5 M Tris(HCl) pH 7.8
7 mM merkapto-etanol
0.1 mM EDTA pH 8.0
0 - 1.0 M NaCl-grádiens

A TNF-termelő klónt 1000 ml LB_{Ap}-ben 37 °C-on 20 órás rázatással felnövesztettük, 4 °C-on 10 percig 4000 g-vel centrifugáltuk, FB-vel mostuk, majd 10 ml FB-ben ultrahanggal homogenizáltuk, és 30.000 g-vel 4 °C-on 60 percig centrifugáltuk. A felülúszót AB-vel 5-szörösére higítottuk, és 10 ml-es, AB-vel telített CPG_{10}-oszlopra (meghatározott pórusméretű üveggyöngy) vittük. Az oszlopot 200 ml AB-vel mostuk, majd 100 ml EB-vel eluáltuk a TNF-t. A frakciók TNF-aktivitását L_{929}-sejteken, fehérjemintázatát SDS-PAGE-n ellenőriztük. A megfelelő tisztaságú TNF-frakciók 0.4-0.6 M NaCl-nál jöttek le az oszlopról. A kiválasztott frakciókat AB-vel szemben dializáltuk (3x4 l; puffercsere 8 óránként) 5 ml-es, AB-vel telített $DEAE_{52}$-oszlopra vittük, 20 ml AB-vel mostuk, majd 0 - 0.15 M KCl (AB-ben) grádienssel eluáltuk. A frakciókat a fent leírt módon L_{929} sejteken és SDS-PAGE-n ellenőriztük. A 90 % fölötti tisztaságú TNF 0.06-0.08 M KCl-nál jött le az oszlopról, ami -20 °C-on évekig tárolható aktivitása elvesztése nélkül.

Emlős sejtek transzformálása (59)

Tranziens transzformálás

T-elegy: I. 250 µl 2X HEBS pH 6.9
II. 125 µl DNS deszt. vízben (20 µg DNS)
125 µl 1 M $CaCl_2$

2X HEBS: 280 mM NaCl
50 mM HEPES
1.5 mM Na_2HPO_4
pH 6.9

Tripszin (per liter): 0.5 g tripszin
0.2 g EDTA
PBS-ben (sterilezés szűréssel)

PBS: 8 g NaCl
0.2 g KCl
1.3 g Na_2HPO_4 X $2H_2O$
0.2 g K_2HPO_4
0.25 ml 1 %-os fenol-vörös (pH-kontroll)

A II.-t nagyon lassan átpipettáztuk I.-be, miközben a pipettával buborékoltattuk. Az így kapott T-elegyet 20 percig szobahőn inkubáltuk.

A sejteket ($2X10^6$ sejt/60 mm P.-csésze) tripszinezés és új P.-csészébe vitel után 18-24 órával kétszer mostuk foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS), rávittük a T-elegyet, 30 percig szobahőn inkubáltuk időnként megmozgatva a csészét; rámértünk 4.5 ml DMEM + 10 % FCS-t, inkubálás (4 h, 37 °C, 5 % CO_2) után leszívtuk a felülúszót, és 2 ml 10 %-os DMSO-val 2 percig inkubáltuk a sejteket. E sokkolást követően kétszer mostuk PBS-sel, majd 5 ml DMEM + 10 % FCS-ben inkubáltuk (37 °C; 5 % CO_2) 48 órán át.

Stabil transzformálás

T-elegy: I. 250µl 2X HEBS pH 7.05
II. 125µl DNS deszt. vízben (8µg DNS)
125µl 1 M $CaCl_2$

2X HEBS: 280 mM NaCl
50 mM HEPES
1.5 mM Na_2HPO_4
pH 7.05

A II.-t nagyon lassan átpipettáztuk I.-be, miközben a pipettával buborékoltattuk. Az így kapott T-elegyet 20 percig szobahőn inkubáltuk.

A sejteket ($2X10^5$ sejt/60 mm P.-csésze) tripszinezés és új P-.csészébe vitel után 18-24 órával kétszer mostuk foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS), rávittük a T-elegyet, 30 percig szobahőn inkubáltuk időnként megmozgatva a P.-csészét, majd

rámértünk 4.5 ml DMEM + 10 % FCS-t, 37 °C-on (5 % CO_2) 4 órán át inkubáltuk. Ezután leszívtuk a felülúszót, és 2 ml 10 %-os DMSO-val 2 percig inkubáltuk a sejteket. E sokkolást követően kétszer mostuk PBS-sel, majd 5 ml DMEM + 10 % FCS-ben inkubáltuk (37 °C; 5 % CO_2) legalább 48 órán át.

Sejtmembrán preparálás (96)

NAP: 10 mM Na-foszfát puffer (pH 7.4)
1 mM $MgCl_2$
30 mM NaCl
1 mM DTT
0.005 mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid)
0.02 % NaN_3
5 µg DN-áz

1. A sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 28 ml jég hideg NAP-pufferben jégen Dounce-homogenizáltuk. Így a sejtek szétestek, a sejtmagok azonban nem. A homogenátumot 10 ml sterilre szűrt, 41 %-os szacharózoldatra rétegeztük, és SW28 rotorban 25ooo fordulattal, 60 percig, 4 °C-on centrifugáltuk, aminek eredményeként 4 frakció alakult ki: 1.(legfelső): citoszol NAP pufferben, 2.(interfázis): sejtmembrán frakció, 3.: szacharóz, 4.(pellet): sejtmag frakció és az épen maradt sejtek.

2. Az interfázist (membránfrakció) leszívtuk, 3 térfogat NAP pufferrel higítottuk, és 2 ml 41 %-os szacharózra rétegezve SW41 rotorban 30ooo fordulattal, 20 per-cig, 4 °C-on centrifugáltuk. Az interfázissal a 2. pontban leírtakat megismételtük.

3. Az interfázist leszívtuk, és egy részét azonnal vizsgáltuk TNF-re, más részét 40 µl-es aliquotokban -80 °C-on tároltuk felhasználásig (Méréseink alapján 4 hétnél hosszabb ideig is eltartható a TNF-aktivitás csökkenése nélkül).

Szelekció neomicin-rezisztenciára

A neomicin-rezisztenciáért felelős plazmiddal (pAG_{60}) történő transzformálás után 48 órával a sejteket 14 napig 300 µg/ml G418-at tartalmazó tápoldatban tenyésztettük. A túlélő kolóniák neomicin-rezisztensek voltak.

Szelekció TNF-rezisztenciára

Az egyes neomicin-rezisztens klónokból $3x10^4$ sejtet 96 lyukú szövettenyésztő lemez lyukaiba vittünk. 37 °C-on (5 % CO_2) éjszakán át inkubáltuk 200 µl DMEM + 10 % FCS-ben, majd a felülúszót eltávolítottuk, és a sejtekre 200 µl DMEM + 10 % FCS-ben 10^4 egység TNF-t és 200 ng aktinomicin D-t adtunk. A tenyészeteket 24 órán át 37 °C-on (5 % CO_2) inkubáltuk, majd mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtlízist. TNF-rezisztensnek azt a klónt tekintettük, amelynek sejtjeinél nem tapasztaltunk lízist.

Felhasznált plazmidok

pAT_{153}, pUc_{18}, pUc_{19}, pBluescript Ks+,

pTNF - (Készítette Tóth Miklós) a humán TNF-α gén pAT_{153} EcoRI helyére beépítve (lásd: 3. ábra),

pD2 - (Készítette Kálmán Miklós; MTA SZBK) a rhTNF 5' végi szintetikus fragmentje pUc_{18} EcoRI-XbaI helyére beépítve (lásd: 3. ábra),

$pUSE_4$ - (Készítette Gyuris Jenő; MTA SZBK) az SV40 enhancerének 100-196 fragmentje XhoI linkerekkel pUc_{18} SalI helyére beépítve (lásd: 12. ábra),

$pER_{VI}/8$ - (Készítették Lukácsovich Tamás és munkatársai; MTA SZBK) pBR_{322}-alapú prokarióta expressziós vektor, amely egy IPTG-indukálható riboszomális promótert, egy polylinkert és egy terminátor szekvenciát hordoz (lásd: 3. ábra),

pLH_4 - (Készítették Lukácsovich Tamás és munkatársai; MTA SZBK) pBR_{322}-alapú prokarióta expressziós vektor, amely egy IPTG-indukálható riboszomális promótert, az E. coli ß-galaktozidáz α-peptidjének kódját, egy polylinkert és két terminátor szekvenciát hordoz (lásd: 8. ábra),

A klónozási munkák megkönnyítésére az alábbi konstrukciókat készítettük:

pKspLA - pBluescriptKs+ XbaI-EcoRI fragmentjét deletáltattuk a polylinkerből, és HindIII helyére beépítettük a korábban pLH_4 polylinkerébe PstI-BamHI helyre klónozott SV40 poly A régiót (lásd: 12. ábra),

pUT_5 - a rhTNF gén XbaI-EcoRI fragmentje pUc_{18} XbaI-EcoRI helyére beépítve (lásd: 7. ábra),

pUHII - a rhTNF gén HincII fragmentje pUc_{18} HincII helyére beépítve (lásd: 15. ábra),

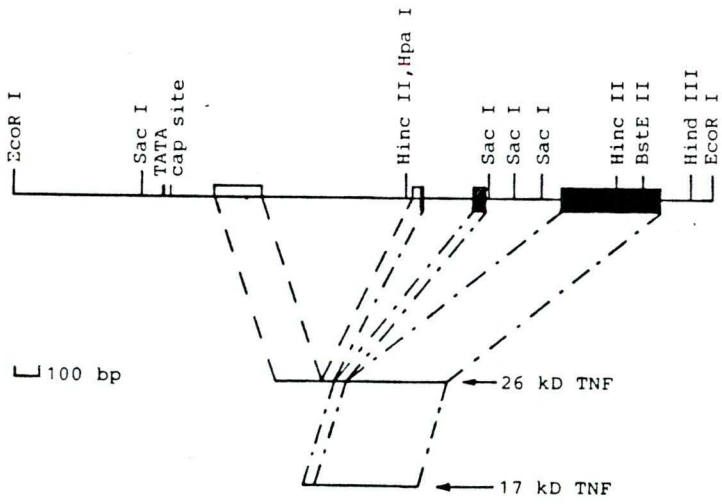
pTΔIX - a hTNF génbe beépítettük a XbaI helyet a rhTNF génből. Ennek eredményeként a hTNF gén III. és IV. exonja egybeépítésével a 3. intron deletált. (lásd: 16. ábra).

KÍSÉRLETI RÉSZ

A rekombináns humán TNF-α gén (rhTNF) klónozása prokarióta expressziós vektorba

A rhTNF módosítását génjének átalakításán keresztül kívántuk megvalósítani. A humán TNF-α (hTNF) gént Tóth Miklós izolálta humán génbankból, és építette be pAT_{153} plazmidba EcoRI helyre (pTNF; 3. ábra).

A gén négy exonját három intron szakítja meg. Az úgynevezett érett TNF-t (17 kD, szolubilis forma) a II. exon vége és a III., IV. exon kódolja (1.ábra).



1. ábra: A humán TNF-α gén szerkezete (polyA régió nélkül)
A vastagítások az exonokat (26 kD TNF), ezen belül a sötét vastagítások a szolubilis forma (17 kD TNF) kódoló szekvenciáit (II. exon vége, III. és IV. exon) reprezentálják.

Országos Központ Könyvtára

Mivel a gén ebben a formában nem expresszáltatható baktériumban, megfelelő átalakításokat kellett végrehajtanunk rajta.

Az érett hTNF-t kódoló szakasz intronjainak kiiktatása érdekében egy 125 bázispár (bp) hosszúságú DNS-fragmentet szintetizáltattunk (Kálmán Miklós, SZBK, Genetikai Intézet), amely hordozza a rhTNF N-terminális 33 aminosavának kódját. A rhTNF kódja egy metionin kodonnal kezdődik, és ezenkívül két bázispárt megváltoztattunk új restrikciós hasítóhelyek kialakításához úgy, hogy az eredeti aminosavsorrend nem változott (2.ábra). (A fragmentet pUc_{18} XbaI-EcoRI helyére beépítve kaptuk pD2 jelzéssel.)

XbaI

tctagatcg ATG GTC AGA TCA TCT TCT AGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT

PstI

PvuII

GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTG

CAG TGG CTG AAC CGC CGGgcccccggacggcgacggcgacggaatt

2. ábra: A szintetikus rhTNF gén-szakasz bázisszekvenciája
A megváltoztatott bázisokat aláhúzással jelöltük, és feltüntettük az új restrikciós enzim felismerőhelyeket. A nagy betűkkel szedett szakasz a rhTNF N-terminális 33 aminosavát kódolja.

A pD2 plazmidot MspI és HindIII enzimekkel hasítottuk, és izoláltuk a megfelelő fragmentet (125 bp), ami tartalmazta a rhTNF gén 5' végi 96 bázispárját (az N-terminális 32 aminosavának kódja). A pTNF plazmidot MspI-gyel vágtuk, és izoláltuk a 758 bp hosszúságú fragmentet, ami a rhTNF gén fennmaradó 378 bázispárját hordozta a transzlációs stop szignállal és 220 bp 3' flanking régióval (a fennmaradó 160 bázispáros szakasz a pUc_{18}-ból származik). A fragmenteket tisztítottuk, és összeligáltuk. A ligálás hatékonyságát 1.4 %-os agarózgélen ellenőriztük, majd tisztítás után SalI és EcoRI enzimekkel emésztettük. A teljes rhTNF-t kódoló 722 bp-os frag-

mentet izoláltuk, és pAT_{153} SalI-EcoRI helyére ligáltuk, majd DH-I kompetens sejtekbe transzformáltuk a ClaI-EcoRI fragment felszaporításához.

A transzformánsok közül 96-ot vizsgáltunk enzimes hasítással. Az első szűrést SalI-EcoRI emésztéssel végeztük, majd a pozitív plazmidokat ClaI-HindIII és végül MspI vágással ellenőriztük. Az így kapott klónok közül a további munkát a pT_{56} jelűvel végeztük.

A plazmidot céziumklorid grádiensen tisztítottuk, majd ClaI-EcoRI enzimekkel kivágtuk a rhTNF gént, és $pER_{23}VI/_8$ jelű prokarióta expressziós vektor (95) ClaI-EcoRI helyére építettük be. A vektor egy IPTG-indukálható riboszomális promótert (lac operátor), egy polylinkert és két terminátor szekvenciát hordoz, ami lehetővé teszi a polylinkerbe klónozott prokarióta vagy prokarióta jellegű gének expresszióját E. coliban (3. ábra).

A transzformánsok (324 telep) első szűrését in situ DNS-hibridizáció módszerével végeztük. Próbaként a pD2 plazmid MspI-XbaI 81 bp-os XbaI végen α-^{32}P-ATP-vel jelölt fragmentjét használtuk. Negatív kontroll a pAT_{153}, pozitív a pT_{56} plazmid volt (1. kép).

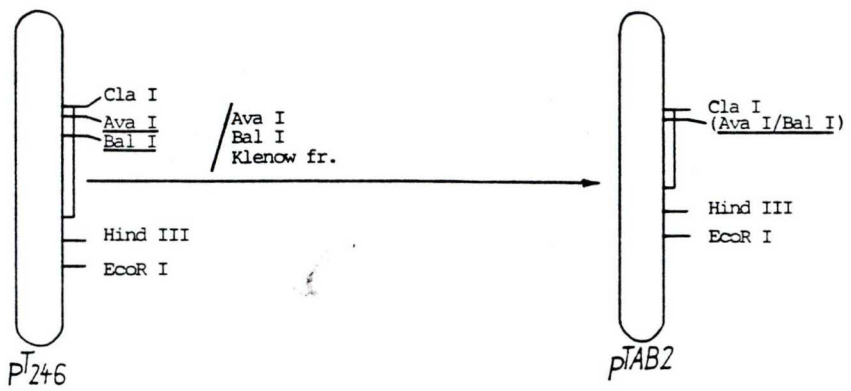
A pozitív, pT_{246} plazmidot hordozó törzsből plazmidot preparáltunk, és ClaI-EcoRI, ClaI-HindIII valamint ClaI-XbaI emésztésekkel ellenőriztük a TNF gén beépülését a vektorba.

A rhTNF gén expressziója E. coli sejtekben

A pT_{246} plazmidot hordozó klónt 1-1 ml LB_{AP}-be oltottuk, és OD_{560}=0.3-nál az egyik tenyészetet 3 mM végkoncentrációjú IPTG-vel indukáltuk 20 órán át 37 °C-on intenzíven rázatva. Kontrollként a DH-I, $PER_{23}VI/_8$, pD2 és a pT_{56} jelű törzset ugyanígy kezeltük.

A tenyészetek 500-500 µl-ét ultrahanggal homogenizáltuk, és L_{929} sejteken teszteltük a TNF-termelést. Az eredményeket az 1. táblázat szemlélteti.

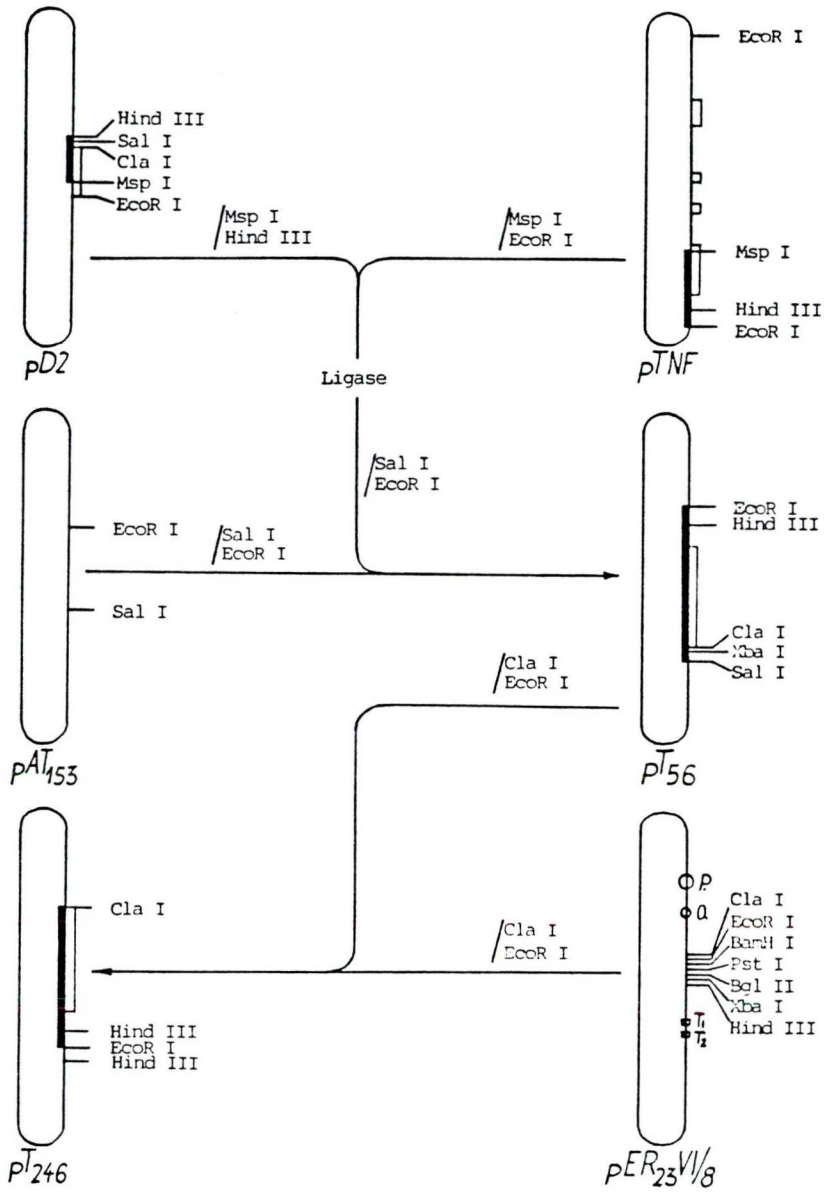
A tenyészetekből 50-50 µl-t lecentrifugáltunk, és SLB-ben felvéve 5 perces forralás után 15 %-os SDS-PAGE-n ellenőriztük az új fehérje megjelenését. A pT_{246} plazmidot ill. az expressziós vektort hordozó klónok fehérjemintázatai a 2. képen láthatók.



4. ábra: 87 bázispáros deléció létrehozása a rhTNF gén 5' vége közelében
A pT_{246} plazmidot AvaI és BalI enzimekkel emésztettük (a vágási helyeket aláhúzással jelöltük), a túlnyúló AvaI véget Klenow fragmenttel feltöltöttük, és az így kapott tompa végeket (blunt end) összeligáltuk.

b. Deléciók az N-terminálist kódoló génszakasztól down-stream

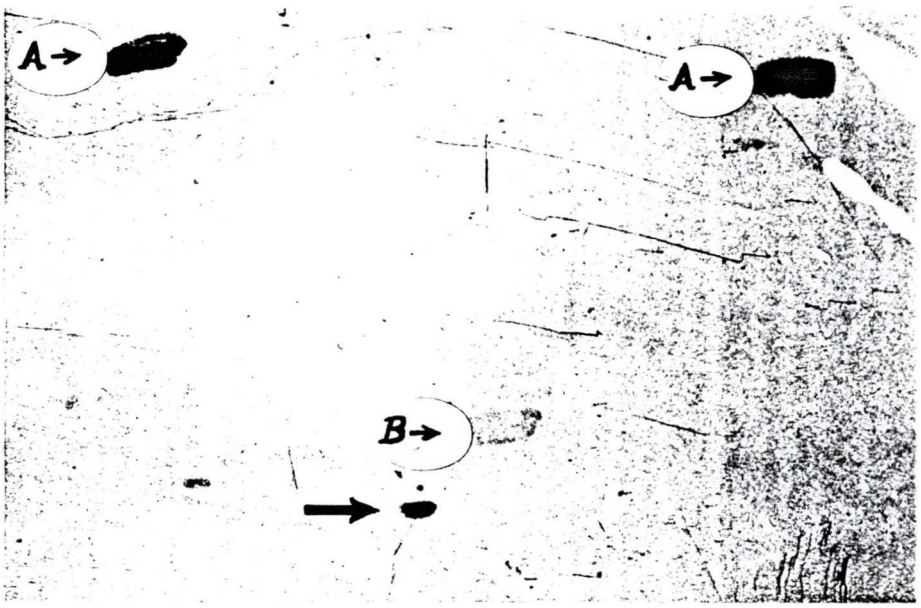
A pT_{246} plazmidot PvuII enzimmel részlegesen emésztettük, majd ligázzal zártuk (A rhTNF génben három PvuII hasítóhely van). A transzformánsok között mindhárom várható variánst sikerült megtalálnunk: pTPD1, amelyből az 1. és 2. PvuII hely közötti 66 bázispár, pTPD2, amelyből az 1. és 3. PvuII hely közötti 300 bázispár, ill. pTPD3, amelyből a 2. és 3. PvuII hely közötti 234 bázispár deletált (5. ábra), azaz sorrendben 22, 100 ill. 78 aminosav a TNF-ből.



3. ábra: A rhTNF-αgén klónozásának vázlata

A pD2 plazmidból MspI-HindIII-emésztéssel kivágtuk a rhTNF gén 5' végét hordozó szakaszt, összeligáltuk a gén fennmaradó részét kódoló fragmenttel, amit a pTNF plazmidból MspI-EcoRI emésztéssel vágtunk ki, és SalI-EcoRI-gyel hasítva a ligátumot (a rhTNF gén teljes szekvenciáját hordozza), pAT_{153} SalI-EcoRI helyére építettük be, majd ClaI-EcoRI helyekkel klónoztuk az expressziós vektorba. (A vastagítások a kivágandó ill. beépített fragmenteket jelölik.)

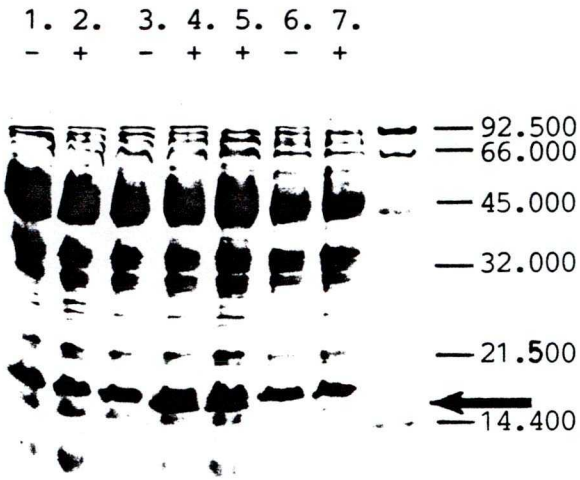
Rövidítések: P.: rrnB promóter, O.: lac operátor, T1,T2: terminációs szignál



1. kép: Az in situ DNS-hibridizáció autoradiográfiás képe.
A: pozitív kontroll (pT_{56}), **B**: negatív kontroll (pAT_{153}), nyíl: pT_{246}

Tenyészet	**IPTG**	**Sejtpusztulás**	**TNF-konc. (egység/ml)**
pT_{246}	—	4 4 3 2 2 1 0 0 0 0 0 0	10^4
pT_{246}	+	4 4 4 4 4 4 4 4 4 3 3 2	$2x10^6$
$pER_{23}VI/_8$	—	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	nem mérhető
$pER_{23}VI/_8$	+	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	nem mérhető
pD2	—	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	nem mérhető
pD2	+	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	nem mérhető
pT_{56}	—	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	nem mérhető
pT_{56}	+	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	nem mérhető
standard		4 4 3 2 1 0 0 0 0 0 0 0	10^4

1. táblázat: A pT_{246} jelű törzs biológiai TNF-tesztje
L_{929} (egér fibroblaszt) sejteken IPTG-indukció nélkül (-) ill. indukciót követően (+). **4**: teljes, **3**: 75 %-os, **2**: 50 %-os, **1**: 25 %-os sejtpusztulás. A standard 10^4 egység/ml kereskedelmi rhTNF. A kontroll törzsek (az expressziós vektor: $pER_{23}VI/_8$, a pD2 plazmid) nem hordozzák a rhTNF gént, vagy a gén nem expressziós vektorban van (pT_{56}), ezért nem fejeződhet ki. (A könnyebb érthetőség érdekében a baktériumtörzseket az általuk hordozott plazmid nevével jelöltük)



2. kép: A rhTNF gén expressziója E. coliban.
1, 2: $pER_{23}VI/_8$; **3, 4, 5**: pT_{246}; **6, 7**: pBR_{322}. ("+": 3 mM IPTG-vel indukált, "-": nem indukált). A megjelent új fehérjét nyíllal, a baktériumtörzseket az általuk hordozott plazmid nevével jelöltük.

A rhTNF tisztítása

A pT_{246} plazmidot hordozó törzsből kiszelektáltunk egy olyan klónt, amely elveszítette IPTG-indukálhatóságát, azonban konstitutív termelése olyan magas maradt, mint korábban indukciót követően. Az új klónt felszaporítottuk 12 literre, összegyűjtöttük (4.000 g, 4 °C, 25 perc), mostuk 2 l AB-vel (4.000 g, 4 °C, 25 perc), 50 ml FB-ben ultrahanggal homogenizáltuk. (Ettől a tisztítási fázistól kezdve minden lépésnél mintát vettünk, amit a későbbiekben SDS-PAGE-n ill. L_{929} sejteken teszteltünk fehérjemintázatra ill. TNF-aktivitásra). A sejttörmeléket 30.000 g-vel (4 °C, 60 perc) leülepítettük. Az így nyert homogenátumot AB-vel 300 ml-re kiegészítettük, és 100 ml-es CPG-oszlopra vittük, amelyen a TNF-aktivitás megkötődött. A nem kötődő fehérjéket 1.000 ml AB-vel távolítottuk el az oszlopról, majd a fehérjénket 500 ml EB-vel eluáltuk 5 ml-es frakciókat szedve. A TNF-aktivitást mutató

fehérje 0.3-0.8 M NaCl-nál jött le az oszlopról. A megfelelő tisztaságú frakciókat (0.4-0.6 M NaCl-nál eluálódtak) összegyűjtöttük (80-100 ml), és kétszer 4 l AB-vel szemben dializáltuk, majd 50 ml-es $DEAE_{52}$-oszlopra vittük, amelyről 200 ml AB-vel eluáltuk a nem kötődő fehérjéket, és 250 ml AB + 0-0.15 M KCl-grádienssel a TNF-aktivitást mutató fehérjét, amely 0.05-0.10 M KCl-nál jött le. A hasonló tisztaságú frakciókat összegyűjtve (0.06-0.08 M KCl között eluálódtak), mintegy 20-30 ml 90 %-nál nagyobb tisztaságú 17.000 D-os fehérjét nyertünk, amely a biológiai tesztek alapján rhTNF-nek bizonyult. (Az in vivo állatkísérleteket a SZOTE Kísérleti Sebészeti Klinikáján Nagy Sándor és munkatársai végezték.) A preparátum aktivitása L_{929} sejteken mérve $5x10^7$ egység/ml, fehérje koncentrációja 2.5 mg/ml volt.

A rhTNF módosítása

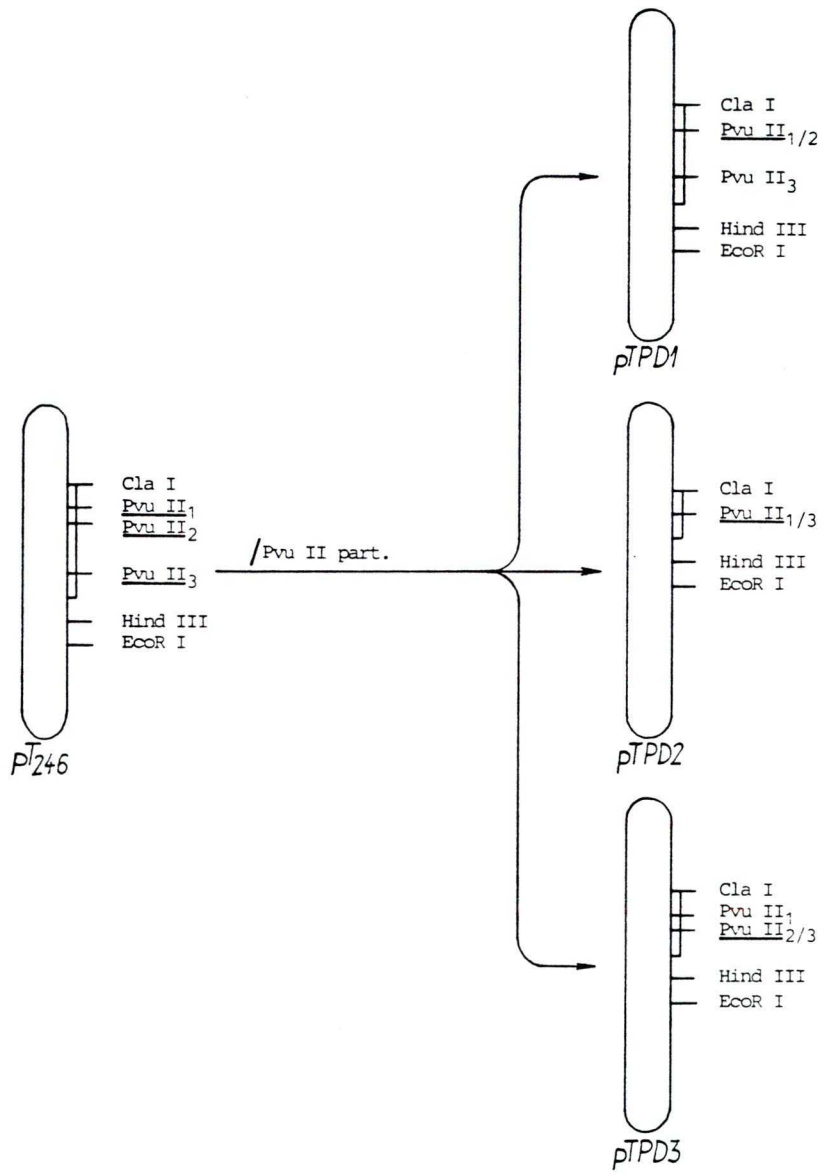
A rhTNF a kezelésekhez szükséges dózisban súlyos következményekkel járó mellékhatásai miatt nem alkalmas daganatterápiás célokra, bár az esetek kis hányadában megoldást jelenthet az intratumorális TNF-kezelés, amikoris az alkalmazott TNF-dózis a szervezet egészét tekintve a letális alatt marad (7,8,47,133). Azonban az esetek többségében a fő problémát azok a tumorok jelentik, amelyek nem körülhatárolhatóak (8,63), vagy amelyeket az orvos még nem fedezett fel (pl. új áttétek). Ezért jobb megoldásnak tűnt a TNF módosítása a mellékhatások (főként a pirogenitás) csökkentése vagy a tumorspecificitás növelése érdekében, illetve olyan inaktív TNF-szerű fehérje (TNF-antagonista) előállítása, amely receptorkötő sajátságát megőrizve, megvédhetné a beteget a TNF legsúlyosabb mellékhatásaitól.

Fenti célok legalább egyikének elérése érdekében a rhTNF génen különböző módosításokat végeztünk.

1. Deléciók

a. Deléció az N-terminálist kódoló génszakaszban

A pT_{246} plazmidot AvaI-BalI enzimekkel emésztettük, a túlnyúló véget Klenow fragmenttel feltöltöttük, majd a plazmidot ligázzal zártuk. Az így kapott pTAB2 plazmidról (4. ábra) termelődött fehérje 8. és 38. aminosava közötti 29 aminosav kiesett; helyettük egy Thr épült be.

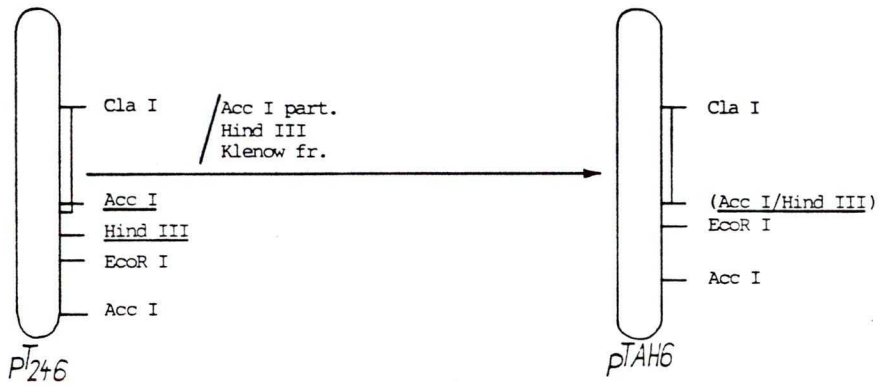


5. ábra: Deléciók létrehozása a rhTNF gén PvuII helyei között

A pT_{246} plazmidot PvuII-vel parciálisan emésztettük, majd ligázzal zártuk (a vágási helyeket aláhúzással jelöltük) A génben lévő három PvuII vágóhelynek megfelelően három konstrukciót kaptunk: pTPD1, amelyből az 1. és 2. PvuII hely közötti 66 bázispárt, pTPD2, amelyből az 1. és 3. PvuII hely közötti 300 bázispárt és pTPD3, amelyből a 2. és 3. PvuII hely közötti 234 bázispárt eliminálták.

c. Deléció a C-terminálison

A pT_{246} plazmidot AccI enzimmel részlegesen és HindIII enzimmel teljesen emésztettük. A túlnyúló végeket Klenow fragmenttel feltöltöttük, és a plazmidot ligázzal zártuk. A két feltöltött vágóhely ligálása egy transzlációs stop jel keletkezéséhez vezetett, ami a 150. aminosav után zárja a transzlációt, ennélfogva a pTAH6 plazmidról (6. ábra) termelődött fehérje C-terminálisáról 7 aminosav hiányzik.



6. ábra: Transzlációs stop szignál (TAG) klónozása a rhTNF gén 150. aminosavkodonja után

A pT_{246} plazmidot AccI enzimmel részlegesen, HindIII-mal teljesen emésztettük (a vágások helyét aláhúzással jelöltük), a túlnyúló végeket Klenow fragmenttel feltöltöttük, és ligázzal zártuk, aminek eredményeként egy transzlációs stop kodon jött létre 21 bázispárral az eredeti stop kodon előtt.

Szövetkultúrás biológiai tesztekben a fenti deléciós fehérjék mindegyike inaktívnak bizonyult mind a TNF-aktivitást, mind a TNF-antagonizmust illetően. Sajnos az SDS-PAGE-eredmények alapján nem tudtuk megállapítani, hogy termelődik-e a kérdéses fehérje. Utóbbi problémát a későbbiek során a fúziós mutánsok segítségével sikerült megoldanunk.

2. Konverziók az N-terminálison

A rhTNF N-terminálisának eredeti aminosavsorrendje:

Met Val Arg Ser Ser Ser Arg ...,

ami elgondolásunk szerint kis változtatással fémkötő szekvenciává alakítható:

Met Arg Cys Ser Cys Ser Arg ...,

amelyben a fémkötést a 3. és 5. Cys -SH-csoportja, a 4. és 6. Ser -OH-csoportja valamint a 2. és 7. Arg $=NH_2^+$-csoportja biztosítja (172).

A megvalósításhoz két oligomert szintetizáltattunk (készítette: Szilák László, MTA, SZBK), amelyeknek bázissorrendje: GGATGAGATGCTCTTGCT, illetve TACTCTACGAGAACGAGATC.

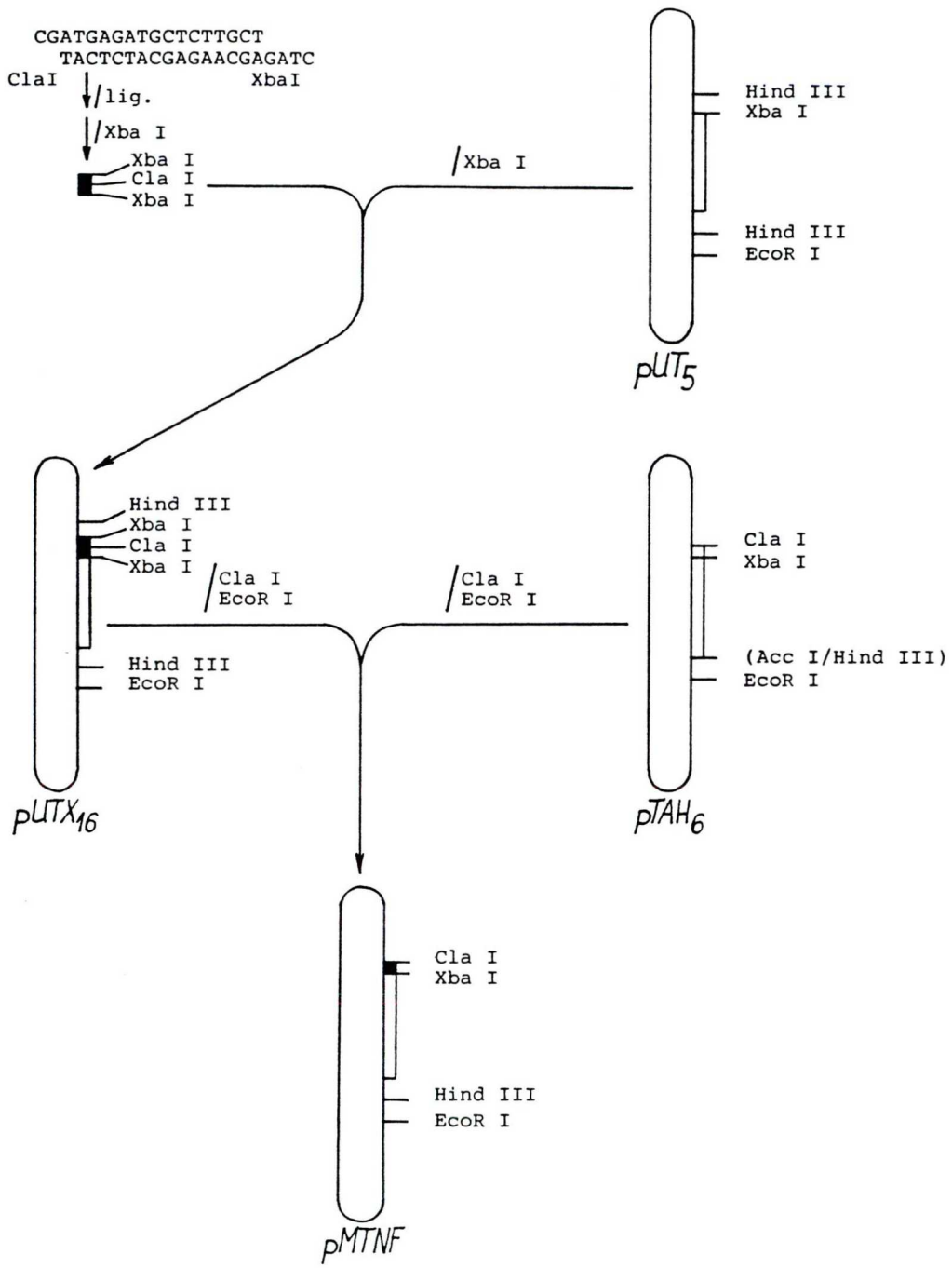
Az oligomereket foszforiláltuk, majd 60 °C-ra felmelegítettük, és lassan lehűtve összeolvasztottuk. Az így kapott ClaI-XbaI fragmenteket ligázzal összekapcsoltuk, és XbaI-gyel vágtuk. Ezzel biztosítottuk, hogy a XbaI fragment bármelyik orientációjú beépülése esetén a ClaI-XbaI szakasz a megfelelő orientációban, és könnyen ellenőrizhető legyen. A XbaI fragmentet pUT_5-be klónoztuk, majd az így előállított $pUTX_{16}$-ból a módosított rhTNF gént ClaI-EcoRI emésztéssel kivágtuk, és egy deléciós rhTNF gén helyére építettük be. Ezzel a beépülés könnyen nyomonkövethető volt (7. ábra).

Miután meggyőződtünk a klónozás sikerességéről, a törzset felszaporítottuk, és a muteint tisztítottuk (Duda Ernő és munkatársai; szabadalmi eljárás alatt).

A tisztított fehérje in vitro aktivitása azonos volt a rhTNF-évl, azonban in vivo tesztekben a keringési féléletideje sokkal hosszabbnak bizonyult, mint a rhTNF-é, ami az in vivo aktivitás növekedését eredményezte (Duda Ernő és munkatársai; közlés alatt).

3. Fúziós peptidek előállítása

Az első fúziós peptideket olyan céllal készítettük, hogy a TNF-molekula trimerizációját vagy a TNF/TNF-receptorkomplex kialakulását sztérikusan gátoljuk, ezzel módosítva a TNF biológiai aktivitását.

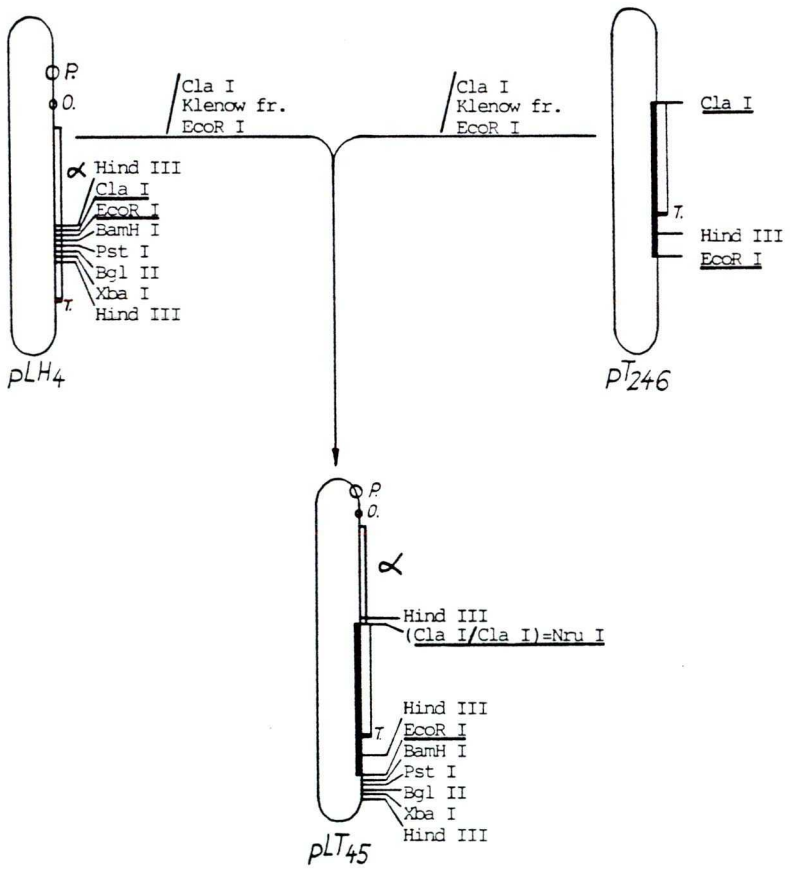


7. ábra: Fémkötő TNF-mutein génjének klónozása

A módosítást hordozó ClaI-XbaI fragmentet ligálás és XbaI-emésztés után (sötét vastagítás) pUT_5 XbaI helyére építettük be (a pUT_5 olyan rhTNF gént hordoz, amelyből hiányzik annak ClaI-XbaI fragmentje). Az így kapott $pUTX_{16}$-ból a módosított TNF gént egy deléciós rhTNF gén helyére klónoztuk a pTAH6 plazmidba, ClaI-EcoRI helyre. Így a kapott pMTNF-ben a beépülés könnyen ellenőrizhetővé vált.

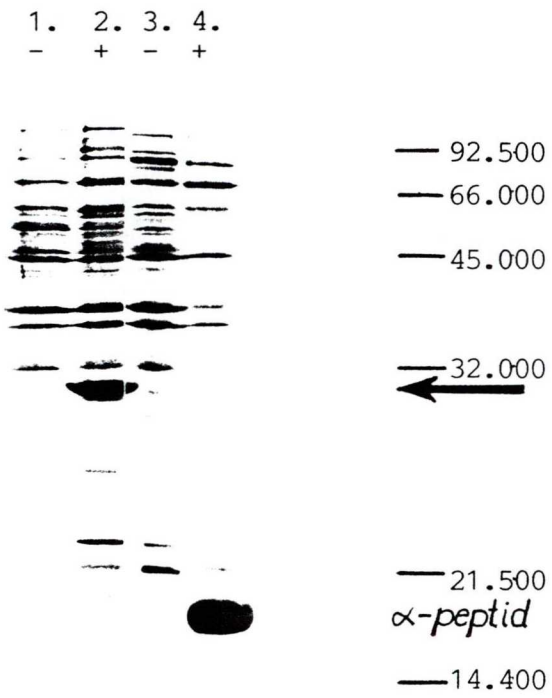
a. ß-galaktozidáz α-peptid-TNF fúzió

A rhTNF gént a pLH_4 expressziós vektor (95) ClaI-EcoRI helyére építettük be a ClaI hely feltöltésével. A klónozás helyességét a feltöltéssel létrehozott NruI hasítóhely emésztésével is ellenőrizhettük a kapott pLT_{45} plazmidon (8. ábra). A vektor a ß-galaktozidáz aktív α-peptidjét kódolja. A ClaI hely feltöltése lehetővé tette az α-peptid-TNF fehérje folyamatos átírását, azaz fúziós peptid szintézisét.



8. ábra: Az α-peptid-TNF fúziós fehérje génjének létrehozása
A pLH_4 expressziós vektort (az α az α-peptid kódját jelöli) és a pT_{246}-ot ClaI-gyel vágtuk, a túlnyúló végeket Klenow fragmenttel feltöltöttük, majd a plazmidokat EcoRI-gyel emésztettük (aláhúzások) és a rhTNF gént hordozó fragmentet (sötét vastagítás) a vektorba ligáltuk.
Rövidítések: P.: rrnB promóter, O.: lac operátor, T.: terminációs szignál

A fúziós peptid termelődése SDS-PAGE-n jól kimutatható volt (3. kép), az L_{929} sejteken mért aktivitás megfelelt az azonos koncentrációjú rhTNF aktivitásának, továbbá a ß-galaktozidáz aktivitás is jól mérhető volt.



3. kép: A ß-galaktozidáz ∝-peptid-TNF fúziós fehérje gélkromatográfiás képe
1, 2: pLT_{45} (a fúziós peptidet kódolja); **3, 4**: pLH_4 (az ∝-peptidet kódolja); "+": 3 mM IPTG-vel indukált, "-": nem indukált; "→": ∝-peptid-TNF fúziós fehérje.

Utóbbi lehetőség késztetett bennünket arra, hogy az általunk alkalmazott módszerekkel ki nem mutatható deléciós mutánsokat ∝-peptiddel fúzionáljuk, és termelődésüket ß-galaktozidáz aktivitásuk alapján bizonyíthassuk: a pTAB2, pTAH6, pTPD1, pTPD2 ill. pTPD3 plazmidokból a XbaI-EcoRI fragmenteket a pLTX plazmid XbaI-EcoRI helyére építettük be (pLTX: a pLH_4 polylinkerének XbaI helyét

feltöltéssel megszüntettük a klónozás megkönnyítése érdekében). A klónozás eredményeként izolált pLAB2, pLAH6, pLPD1, pLPD2, pLPD3 plazmidok (9. ábra) mutáns TNF génjeiről átíródó delécios fehérjék mindegyike aktív volt a ß-galtesztben, ugyanakkor az in vitro biológiai tesztben TNF-re nézve mindegyik fehérje teljesen inaktívnak bizonyult.

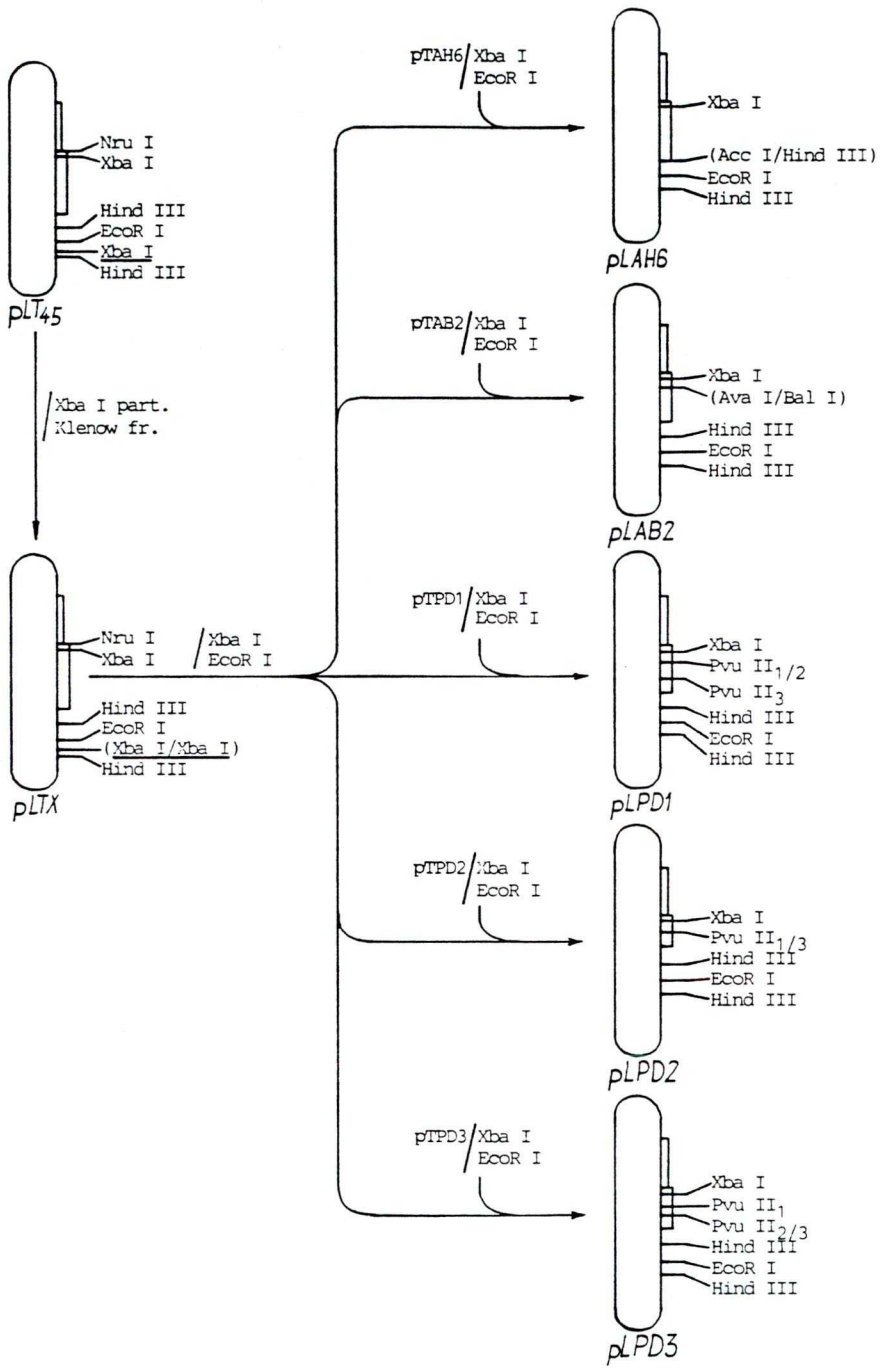
b. TNF-TNF fúzió

Miután az előző kísérletekből kapott erdmények azt mutatták, hogy az -peptid-rhTNF fúziós fehérje megőrizte mind a ß-galaktozidáz, mind a TNF aktivitását, másrészt a rhTNF C-terminális delációja teljes inaktivitást eredményezett (pLAH6), azt kívántuk vizsgálni, hogy egy, a TNF-fel majdnem azonos, de inaktív fehérjével történő fúzió eredményez-e változást a TNF aktivitásában, gátolja-e a trimer kialakulását vagy a receptorkötést.

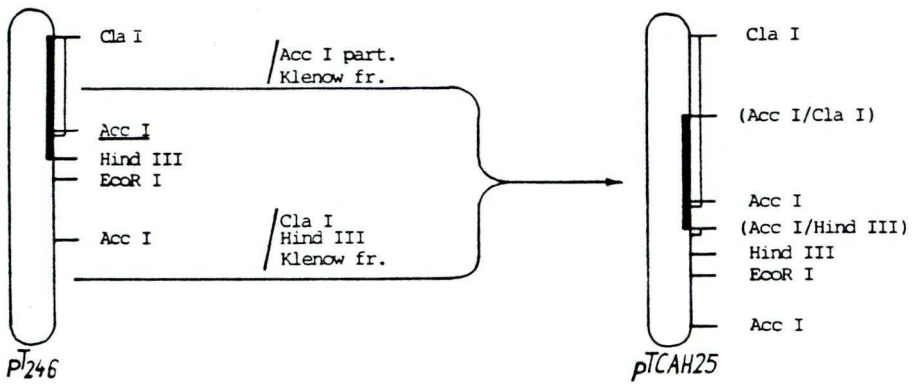
A rhTNF gén ClaI-HindIII fragmentjét a pT_{246} plazmid AccI helyére építettük be ($pTCAH_{25}$). Az így kapott génről (10. ábra) a TNF-szekvencia közel kétszer íródik át megszakítás nélkül, létrehozva egy 7 aminosavnyi C-terminális deléciót hordozó és egy teljesen ép rhTNF-molekula fúzióját.

Ez a "tandem" fehérje in vitro biológiai tesztekben ugyanolyan aktivitást mutatott, mint a rhTNF.

Felvetődött a kérdés, vajon annak a TNF-molekulának, amely eleve trimerként szintetizálódik, megváltozik-e az aktivitása. A kérdés megválaszolására a $pTCAH_{25}$ plazmidot tovább módosítottuk XbaI részleges és EcoRI teljes emésztéssel hasítva a vektort és az inszertet is. A ligálás és transzformálás után sikerült olyan klónt izolálnunk, amely a rhTNF gén három fúzionált majdnem teljes kópiáját hordozza (11. ábra). A pTTT plazmidról N-C-terminális irányban kétszer a 7 aminosav deléciót hordozó, plusz egy teljes aminosav szekvenciájú rhTNF íródik át, és in vitro biológiai aktivitása azonos a rhTNF-évl.

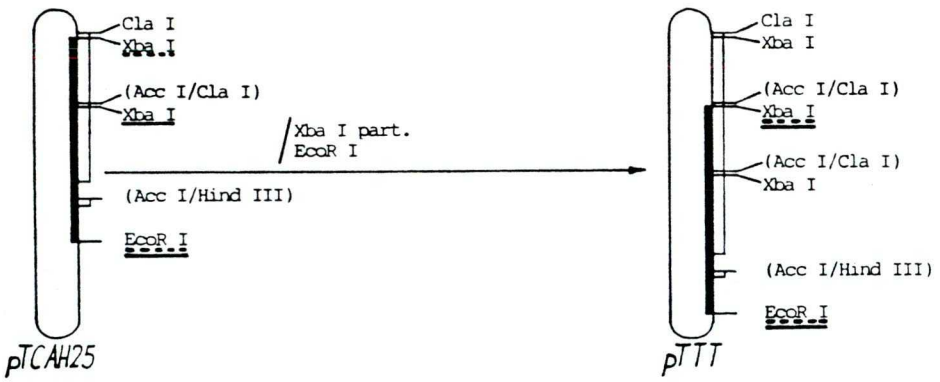


9. ábra: A deléciós rhTNF gének ∝-peptid génnel történő fúziójának klónozási vázlata
A pLT_{45} plazmid TNF génen kívüli XbaI helyét (aláhúzva) feltöltéssel megszüntettük, majd az így kapott pLTX plazmid XbaI-EcoRI helyére építettük be a deléciós rhTNF gének XbaI-EcoRI fragmentjeit.



10. ábra: Az rhTNF fúziós dimer gén klónozási vázlata

A pT_{246} plazmidot AccI-gyel parciálisan emésztettük (a vágási helyet aláhúzással jelöltük), a túlnyúló végeket Klenow fragmenttel feltöltöttük, és az így előkészített vektorba ligáltuk az ugyancsak pT_{246}-ból ClaI-HindIII emésztéssel kivágott, Klenow fragmenttel feltöltött, rhTNF gént hordozó fragmentet (sötét vastagítás).



11. ábra: Az rhTNF fúziós trimer gén klónozási vázlata

A $pTCAH_{25}$ (fúziós dimer gént hordozó) plazmidot XbaI-gyel parciálisan, EcoRI-gyel teljesen emésztettük, majd a fúziós dimert kódoló fragmentet (sötét vastagítás) a csak a C-terminális-deléciós rhTNF kódot hordozó vektorba ligáltuk. (Az inszert vágási helyeit szaggatott, a vektoréit folyamatos aláhúzással jelöltük)

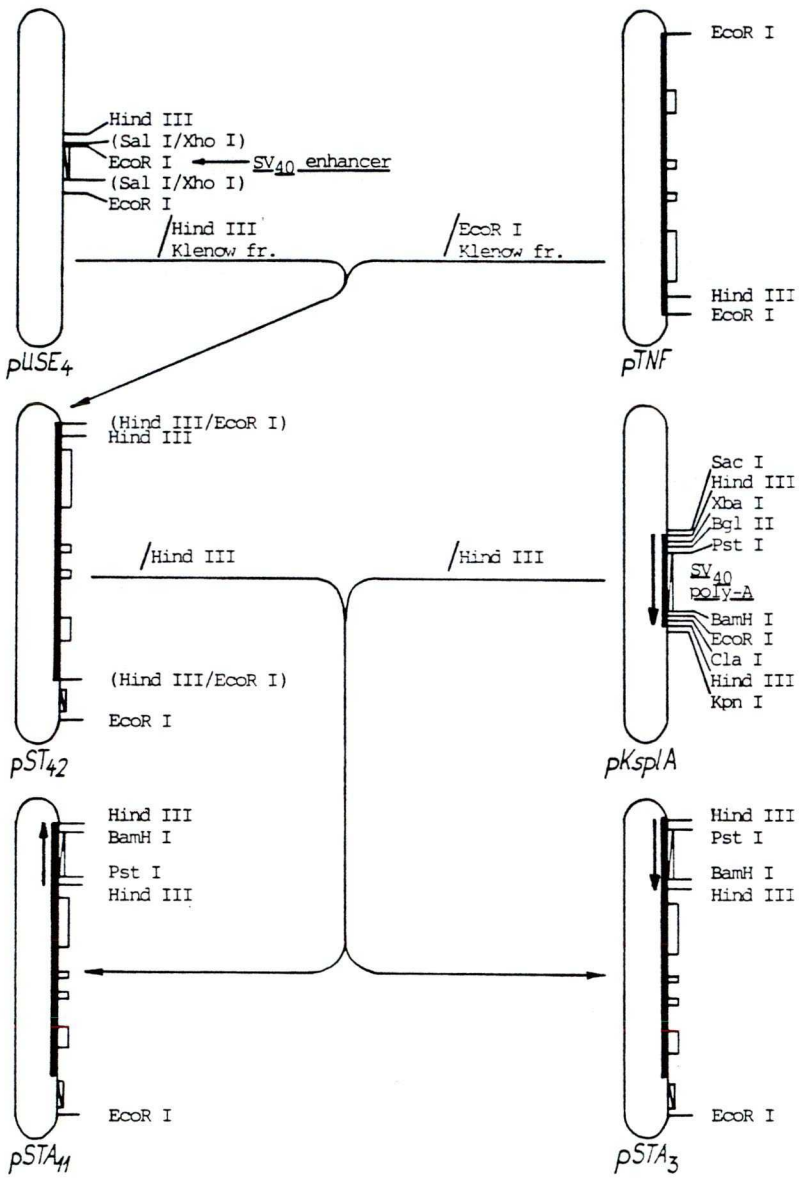
Természetes humán TNF előállítása

Az eddigi kísérleteink során előállított TNF-mutánsok egy része megőrizte TNF-aktivitását (pLT_{45}, $pTCAH_{25}$, pTTT), és az inaktív mutánsok (pLAH6, pLAB2, pLPD1, pLPD2, pLPD3) nem kötődtek, vagy nem olyan erősen a TNF-receptorokhoz, hogy gátolhassák a TNF toxicitását in vitro biológiai tesztekben, ezért más irányból próbáltuk megközelíteni a TNF-toxicitás kérdését.

Az irodalmi adatok arra utaltak, hogy a természetes hTNF mellékhatásai sokkal gyengébben nyilvánulnak meg, mint a rhTNF-éi (114), azonban rendkívül kis mennyiségben termelődik ahhoz, hogy gyógyításra vagy módosítási kísérletekre alkalmas legyen, tehát elsősorban olyan sejtvonalra volt szükségünk, amely a természetes humán TNF-t nagy mennyiségben termeli.

Ennek érdekében első lépésként a TNF gént eukarióta expressziós vektorba építettük be (12. ábra), majd ezzel a plazmiddal ($pSTA_{11}$) TNF-rezisztens HeLa sejteket transzformáltunk. Kotranszformációra a neomicin-rezisztenciáért felelős pAG_{60} plazmidot használtuk, amivel biztosítani tudtuk a pozitív szelekciót . A transzformánsokat G418 jelenlétében tenyésztettük, majd vizsgáltuk a neomicin-rezisztens sejtvonalak TNF-termelését, mérve a tápoldatok TNF-aktivitását 48 órás inkubálás után (2. táblázat).

A legjobb TNF-termelő sejtvonalat (HA_{11}) felszaporítottuk, és a természetes hTNF-t a rhTNF-hez hasonló módon tisztítottuk. A természetes hTNF in vitro hatásában azonosnak bizonyult a rhTNF-fel, in vivo azonban sokkal alacsonyabb toxicitást mutatott, mint a rhTNF (Duda Ernő és munkatársai; nem publikált adatok).



12. ábra: Természetes hTNF gén klónozása eukarióta expressziós vektorba

A pTNF-ből EcoRI-gyel kivágtuk a TNF gént (sötét vastagítás; a világos vastagítások az exonokat reprezentálják), és Klenow fragmenttel történt feltöltés után $pUSE_4$ Klenow fragmenttel feltöltött HindIII helyére ligáltuk. Az így kapott pST_{42} plazmid HindIII helyére építettük be a pKspLA-ból HindIII-mal kivágott SV40 poly A szignált hordozó fragmentet, ami kétféle orientációban épült be (a nyilak a fragmentet és az 5'-3' irányt jelzik).

klónok száma	klónok TNF-aktivitása (egység/ml)
3	0
6	10^2
2	$5x10^2$
7	10^3
3	$5x10^3$
3	10^4
1	$2x10^5$

2. táblázat: Természetes hTNF-t ($pSTA_{11}$) és neomicin-rezisztenciát hordozó (pAG_{60}) plazmidokkal kotranszformált 25 random kiválasztott, neomicin-rezisztens HeLa sejtvonal 48 órás felülúszójának TNF-aktivitása L_{929} sejteken mérve.

1 egységnek tekintettük azt a TNF-mennyiséget, amely a 96 lyukú szövettenyésztőlemez egy lyukában lévő $3x10^4$ sejt 50 %-ának lízisét okozza 1 μg/ml aktinomicin D jelenlétében 24 órás, 37 °C-on történő inkubálás alatt.

A természetes humán TNF módosítása

A klónozását követő néhány éven belül kiderült, hogy a TNF egy 26 kD mólsúlyú prekurzorként szintetizálódik a makrofágokban (32,84,94), és a sejtmembránhoz kötődve fejti ki tumorpusztító hatását (84). Azonban nagyon gyorsan lehasad a 17 kD forma, és a keringésbe kerülve a mellékhatások erősen kifejeződésre jutnak: sok gén aktiválódik (köztük interleukinok, interferonok, TNF stb), ami olyan sejtek halálát is előidézi, amelyeket a TNF-termelő makrofág egyébként nem pusztított volna el. Felmerült a kérdés, hogy vajon a TNF rögzíthető-e a TNF-termelő sejt felszínéhez, és ha igen, megőrzi-e tumorsejtpusztító tulajdonságát. Ezért a TNF-t megpróbáltuk úgy módosítani, hogy a feltételezett enzim hasítási helyét delécióval megszüntetjük,

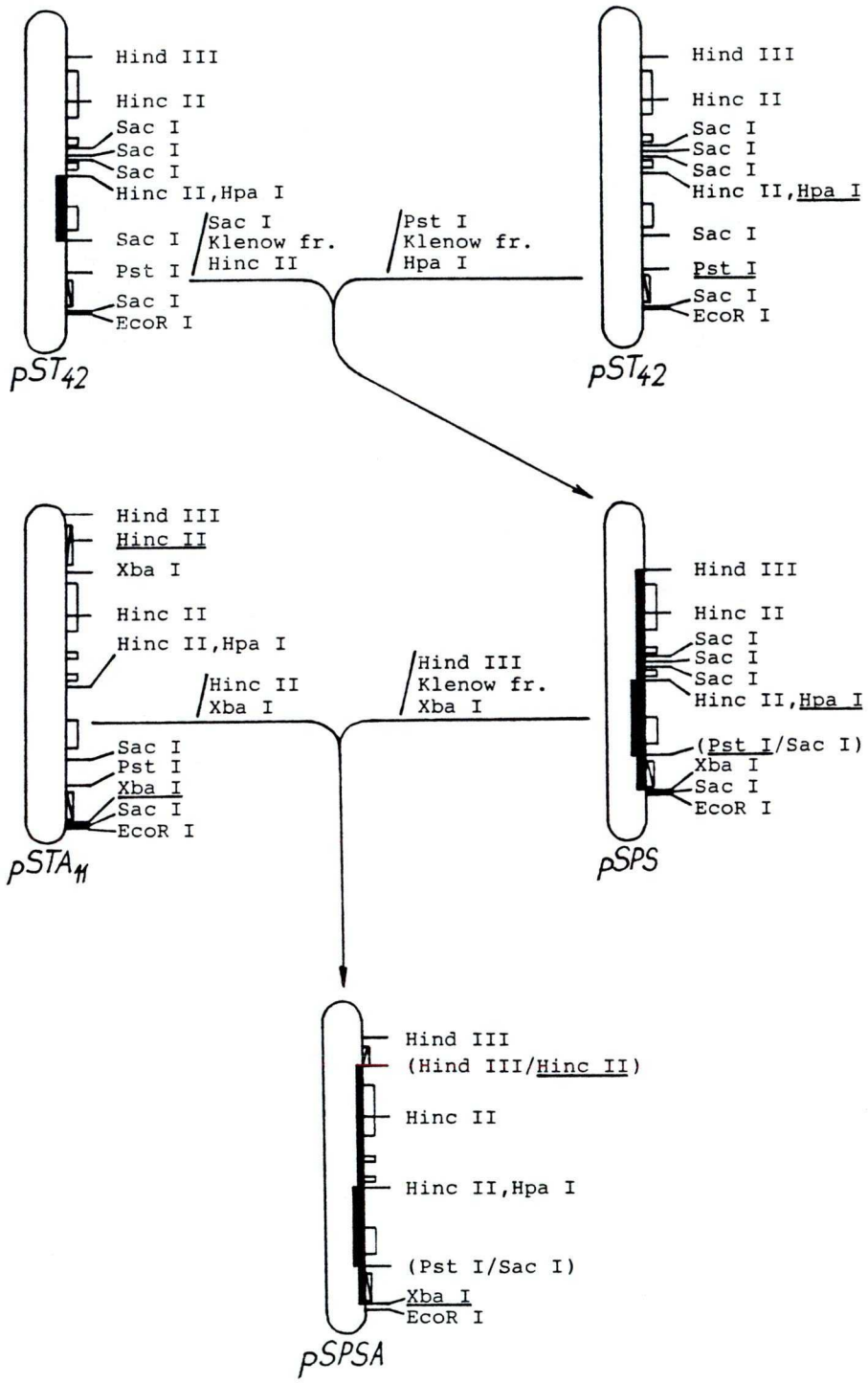
miáltal a 17 kD forma feltevésünk szerint nem jelenhet meg.

1. A 78. aminosav (Arg) deléciója, és a 79. aminosav (Ser) konverziója Thr-ra

A $pSTA_{11}$ plazmidot némileg módosítottuk a további klónozási munkák megkönnyítése érdekében (13. ábra). Az így kapott pSPSA plazmid (a transzformációs kísérletekben a $pSTA_{11}$-el azonos módon viselkedik) III. illetve II. exont hordozó MboI fragmentjeit izoláltuk, majd a III. exont hordozónak első túlnyúló bázisát (C) Klenow fragmenttel dGTP jelenlétében feltöltöttük, a fennmaradó GAT túlnyúló bázisokat és ezzel párhuzamosan a II. exont hordozó MboI fragment túlnyúló végeit Mung Bean nukleázzal leemésztettük, a fragmenteket ligázzal összekapcsoltuk, HincII enzimmel kivágtuk a módosított szakaszt, és pSPSA Hinc II helyére beépítettük. A procedúra eredményeként a III. exon 5' végi Mbo I felismerőhelynek a GAT bázistriplet deléciójával SfaNI felismerőhellyé kellett átalakulnia. Tehát a módosítás helye és pontossága SfaNI hasítással is ellenőrizhető volt. Továbbá a vághatóság azt is bizonyította, hogy az intron-exon-határ érintetlen maradt (14.ábra).

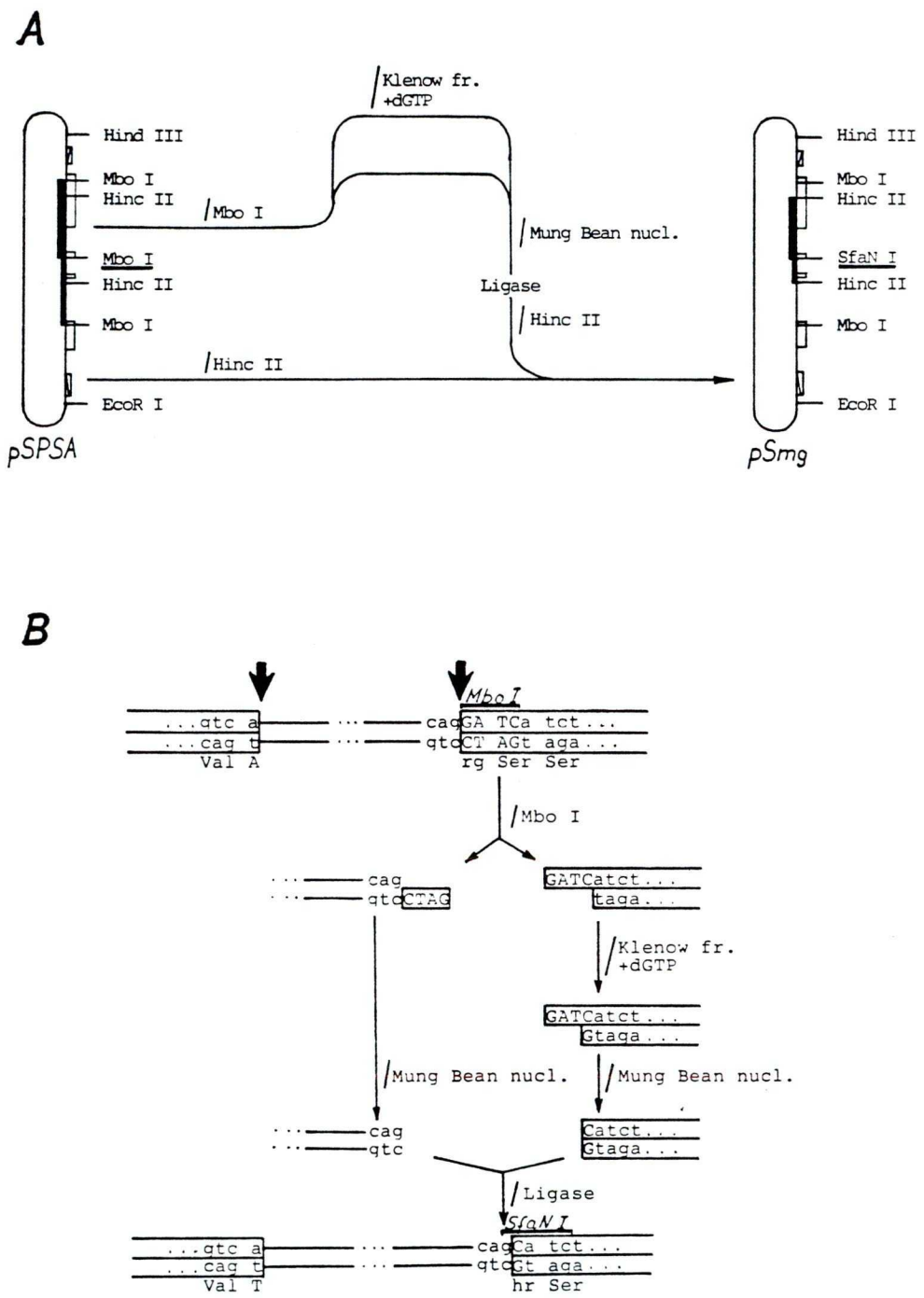
Az így előállított pSm_9 plazmiddal HeLa sejteket transzformáltunk, kotranszformációra a neomicin-rezisztenciát hordozó plazmidot használva. A neomicin-rezisztens klónok közül random kiválasztottunk huszat, felülúszóikból mintát vettünk, a sejteket lekapartuk (10^6 sejt/minta), háromszor mostuk PBS-sel, 500μl végtérfogatban ultrahanggal homogenizáltuk, és mértük a minták TNF-aktivitását.

A TNF-termelést tekintve nem találtunk két azonos sejtvonalat. Azonban találtunk olyan klónokat, amelyek termeltek TNF-t, de az nem szekretálódott a tápoldatba, azaz feltehetően membránkötött maradt. Továbbá olyanokat, amelyek sejtjei sokkal nagyobb koncentrációban tartalmaztak TNF-t, mint a felülúszójuk, míg a nem mutáns génnel transzformált sejtek esetében ez az arány fordított volt (3. táblázat), ami arra enged következtetni, hogy a 17 kD forma lehasadása a mutein esetében gátolt.



13. ábra: A TNF gén 5' és 3' flanking-jének rövidítése

A pST_{42} egy részét SacI-gyel, másik részét (vektor) PstI-gyel emésztettük. A túlnyúló végeket Klenow fragmenttel visszavágtuk, majd HincII-vel kivágtuk az átviendő fragmentet (sötét vastagítás), ill. HpaI-gyel a vektort, és a fragmentet utóbbiba beépítettük. A kapott pSPS-ből HindIII (feltöltve)-XbaI emésztéssel kivágtuk a TNF gént, amelynek 5' flanking-jéből 520 bázispárt eliminálunk, és $pSTA_{11}$ XbaI-HincII helyére beépítettük. Ennélfogva a 3' flanking is rövidült 580 bázispárral (a vágási helyeket aláhúzással jelöltük).



14. ábra: "A": A természetes hTNF gén III. exonja első három bázispárjának deletálása A pSPSA-t MboI-gyel vágtuk. A megfelelő két fragmentet (sötét vastagítás) izoláltuk. A III. exont hordozó fragment (erősebb vastagítás) túlnyúló végének első bázisát (C) - csak dGTP-t adva a reakcióhoz - Klenow fragmenttel feltöltöttük, majd mindkét fragment túlnyúló végét Mung Bean nukleázzal leemésztettük. A fragmenteket összeligáltuk, HincII-vel kivágtuk a módosított szakaszt, és pSPSA HincII helyére beépítettük (A módosítás helyét aláhúzással jelöltük).

"B": A módosítás szemléltetése a bázisok kiírásával

(A hármas vonal az exonokat, a kettős az intronokat jelképezi. Az exon-intron ill. intron-exon határokat sötét nyíl mutatja. Az enzim felismerőhelyeket dőltbetűs felirat jelzi.)

sejtvonal	TNF-koncentráció (egység/ml)	
	sejt	felülúszó
1.	$5x10^4$	$5x10^3$
2.	$5x10^4$	10^3
3.	$5x10^4$	10^2
4.	10^4	10^2
5.	10^3	10^2
6.	10^3	nem mérhető
7.	$5x10^2$	nem mérhető
8.	50	nem mérhető
9.	$2x10^5$	$5x10^2$
HA11	$2x10^3$	$2x10^5$

3. táblázat: A pSm_9 plazmiddal (kotranszformáns a neomicin-rezisztenciát hordozó pAG_{60}) transzformált 20 random kiválasztott neomicin-rezisztens HeLa klón reprezentánsainak TNF-koncentráció-megoszlása a sejteket, ill. felülúszójukat tekintve. Kontrollként a HA_{11} TNF-termelő HeLa sejtvonalat használtuk. A felülúszókból mintát vettünk, a sejteket (10^6 sejt/minta) lekapartuk, háromszor mostuk PBS-sel, 500 µl végtérfogatban PBS-ben ultrahanggal homogenizáltuk, és mértük a minták TNF-aktivitását.

A mért TNF-aktivitások alapján számunkra a fenti táblázat 6., 7. és 9. számú klónja érdekes, mivel a 6. és 7. számú sejtvonalak felülúszójában nem tudtunk TNF-t kimutatni, csak a sejtekben, a 9. számú klón felülúszójában pedig több, mint két nagyságrenddel alacsonyabb TNF-koncentrációt mértünk, mint a sejtekben, és a TNF-aktivitás utóbbiban volt a legmagasabb. Fenti klónok esetében azt vizsgáltuk, hogy a TNF-aktivitás a sejt melyik frakciójához rendelhető.

A sejtvonalakból membránt preparáltunk, és mértük minden frakció TNF-aktivitását. Méréseink alapján megállapíthattuk, hogy az összes TNF-aktivitást a membrán frakció hordozta. Más frakciókból nem sikerült TNF-aktivitást kimutatnunk, ami megerősíteni látszott azt a feltevésünket, hogy a módosított TNF membránkötött. (Sajnálatos módon a 6. és 7. számú sejtvonalak esetében a preparálási procedúra során a TNF-aktivitás megszűnt.)

A továbbiakban vizsgáltuk a 9. számú klón által termelt Sm_9 mutein TNF-aktivitásának változását:

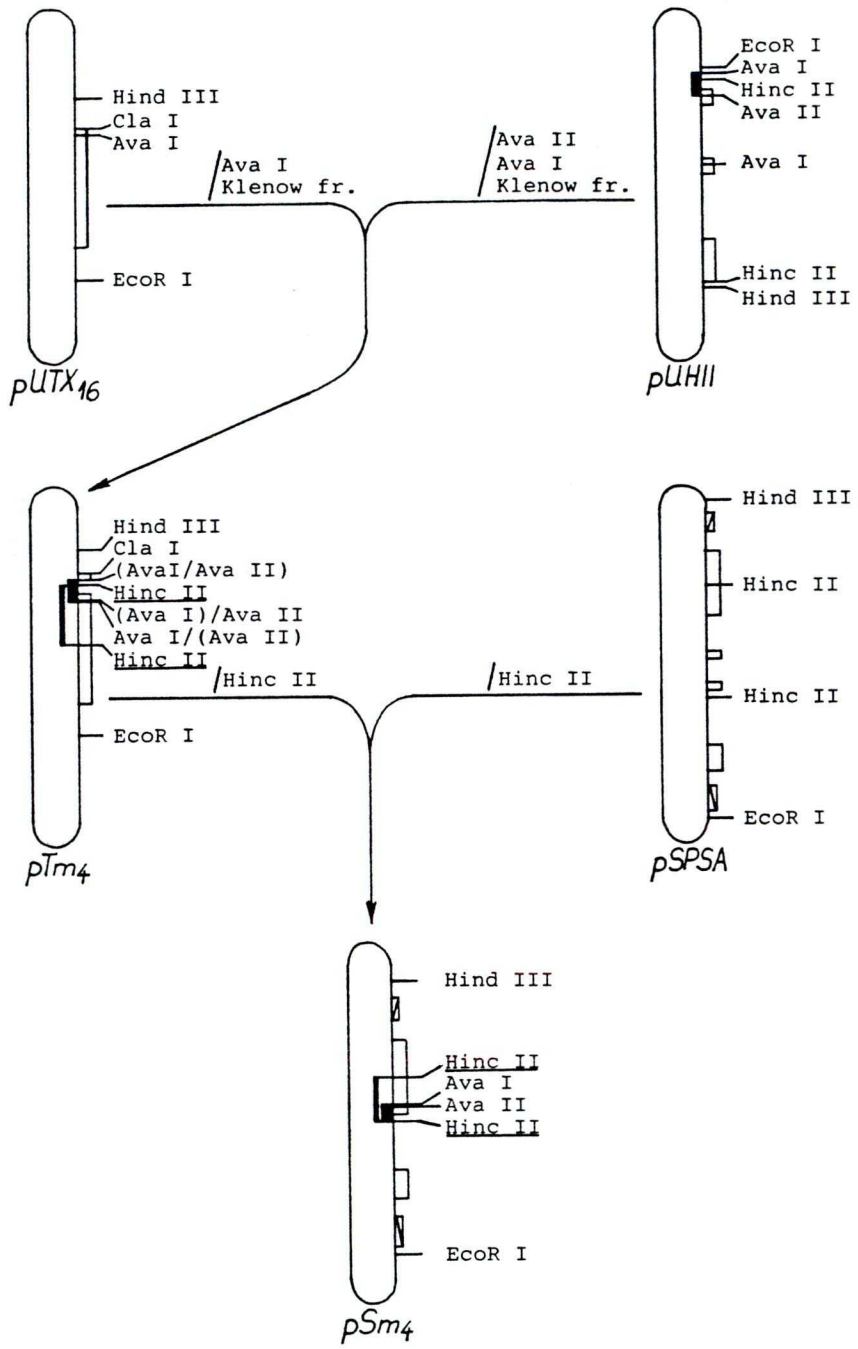
A membránfrakciót ultrahanggal kezelve az Sm_9 aktivitása nem csökkent, azonban szolubilizálva (oktilglikozid) az Sm_9 elvesztette aktivitását. Azaz csak a membránhoz kötődve mutatott TNF-aktivitást.

Duda Ernő és munkatársai a szolubilizált Sm_9 fehérjét liposzóma-membránba ültették, így visszanyerték a TNF-aktivitás nagy részét (Nem publikált adatok).

2. 17 aminosav deléciója a 66. és 84. aminosavak között

Ehhez a klónozáshoz a fémkötő mutein génjét hordozó $pUTX_{16}$ plazmidot (7. ábra) és a hTNF gén HincII fragmentjét tartalmazó pUHII plazmidot használtuk a további lépések megkönnyítése érdekében. A pUHII plazmidból AvaI és AvaII enzimekkel kivágtuk az inszertet, a túlnyúló végeket Klenow fragmenttel feltöltöttük, és a $pUTX_{16}$ Klenow fragmenttel feltöltött AvaI helyére beépítettük. A transzformálás után izolált pTm_4 plazmidból HincII-vel kivágtuk a módosítást hordozó szakaszt, és pSPSA HincII helyére építettük be. Az így kapott pSm_4 plazmidban a TNF gén II. exonjának 3' vége, 2. intronja, III. exonjának 5' vége és 3. intronja deletált (15. ábra), ami a 26 kD fehérje 67-től 83-ig terjedő aminosavainak kiesését eredményezte.

Ez a deléciós fehérje a biológiai tesztekben nem mutatott TNF-aktivitást.



15. ábra: A természetes hTNF AvaI-AvaII fragmentjének deletálása

A $pUTX_{16}$-ot AvaI-gyel emésztettük, és Klenow fragmenttel feltöltöttük (klónozó vektor). A pUHII-ből AvaI-AvaII-emésztéssel kivágtuk a megfelelő fragmentet (sötét vastagítás), túlnyúló végeit Klenow fragmenttel feltöltöttük, és a klónozó vektorba ligáltuk. Az így kapott pTm_4-ből a módosított génszakaszt HincII-vel kivágtuk, és pSPSA HincII helyére (aláhúzással jelölve) beépítettük.

TNF-érzékeny sejtek transzformálása hTNF génnel

Munkánk további részében azt kívántuk vizsgálni, hogyan viselkednek a TNF-érzékeny sejtek, ha a TNF-t nem kívülről kapják, hanem az magában a sejtben szintetizálódik, ahol a sejtfelszíni TNF-receptorokkal nem találkozhat abban a formában, ahogyan a kívülről bejutó TNF.

Ehhez a munkához az egyik legérzékenyebb sejtvonalat, az L_{929}-et transzformáltuk a $pSTA_{11}$, hTNF-t kódoló vektorral (kotranszformáns a neomicin-rezisztenciáért felelős pAG_{60} volt). Meglepetésünkre a neomicin-rezisztens sejtvonalak mindegyike TNF-rezisztens volt, és minden rezisztens klón jól mérhető mennyiségű TNF-t termelt. A kísérletet többször megismételve is azt kaptuk, hogy a TNF-rezisztens sejtek minden esetben egyben TNF-termelők is, és csak a TNF-rezisztens sejtek TNF-termelők. Ugyanakkor a csak pAG_{60}-nal, vagy a pAG_{60} - pTNF-fel (A pTNF-ben a TNF génnek nincs poly A szignálja, aminek következtében az mRNS-érés gátolt, így a transzláció is.) transzformáltak között nem találtunk sem TNF-rezisztens, sem TNF-termelő sejteket.

TNF-érzékeny sejtek transzformálása módosított TNF génekkel

A természetes hTNF génnel transzformált L_{929} sejtek TNF-rezisztenciája és TNF-termelése kézenfekvővé tette az alábbi kérdéseket:

1. TNF-rezisztenciát csak a nem mutáns TNF-t termelő sejtek mutatnak, vagy a mutánst termelők is?
2. Csak az aktív TNF-mutánst termelők lesznek TNF-rezisztensek, vagy az inaktívat termelők is?
3. Kiváltható-e TNF-rezisztencia a TNF szolubilis formáját kódoló gén bevitelével?

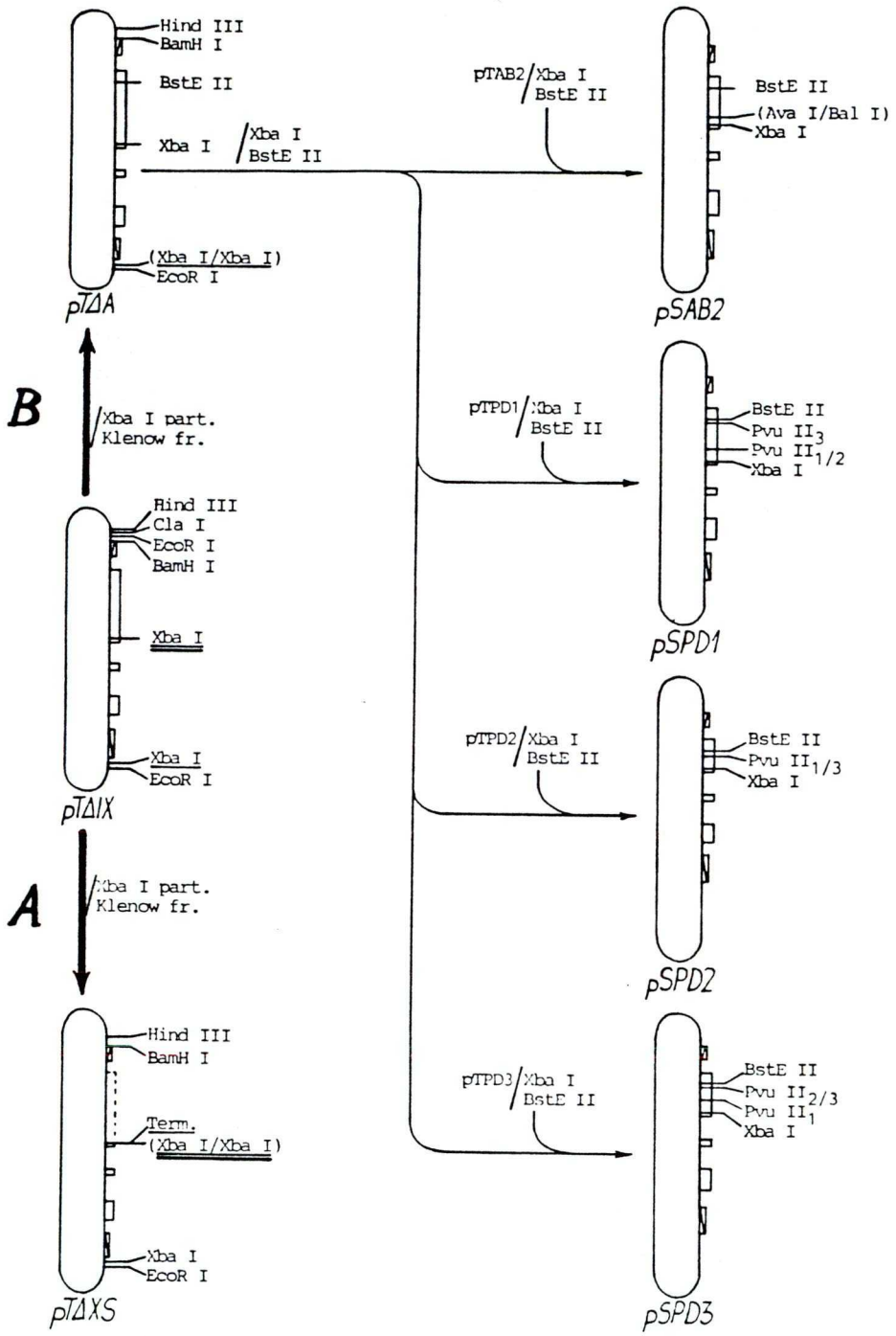
Az első kérdésre az L_{929} sejtek pSm_9 (membránkötött TNF-t kódoló) plazmiddal történt transzformálásának eredménye adott választ. A $pSTA_{11}$-hez hasonlóan a pSm_9 is TNF-rezisztenciát váltott ki az L_{929} sejtekben.

A másik két kérdés megválaszolásához elkészítettünk egy olyan deléciós sorozatot (4. táblázat, 19. ábra), amely a TNF gén szinte minden részére kiterjed: a pTΔXS plazmidról (16. ábra, "A" klónozási út) a teljes (26 kD) TNF-nek csak az első 81

aminosava íródik át (ebben a szakaszban van a membránkötésért felelős régió), a pHRT plazmid a TNF-nek csak a szolubilis formáját kódolja (18. ábra), a többi konstrukcióban felhasználtuk a prokarióta expressziós vektorban már meglévő delécios mutánsainkat, amelyek segítségével az alábbi plazmidokat hoztuk létre: a pSAB2, pSPD1, pSPD2, pSPD3 a 17 kD-os fehérjerész delécióit kódolja (16.ábra, "B" klónozási út), a pSAH6 pedig a C-terminális 7 aminosav delécióját (17. ábra). A plazmidokkal (a megfelelő kontrollok mellett) TNF-érzékeny L_{929} sejteket transzformáltunk, és azt az eredményt kaptuk, hogy a TNF-rezisztencia csak a TNF-aktivitást mutató fehérjét termelő sejtekben alakult ki (4. táblázat).

Plazmid	**Hivatkozási ábra száma**	**TNF-aktivitás**	**TNF-rezisztencia**
$pSTA_{11}$	12.	+	+
pSPSA	13.	+	+
pSm_4	15.	—	—
pSm_9	14.	+	+
pTΔIX	16	—	+
pTΔXS	16.	—	—
pTΔA	16.	+	+
pSAB2	16.	—	—
pSPD1	16.	—	—
pSPD2	16.	—	—
pSPD3	16.	—	—
pSAH6	17.	—	—
pHRT	18.	—	—

4. táblázat: A TNF-érzékeny L_{929} sejtek TNF-termelése és -rezisztenciája aktív és inaktív TNF-t ill. TNF-muteineket kódoló plazmidokkal történt transzformálás után.

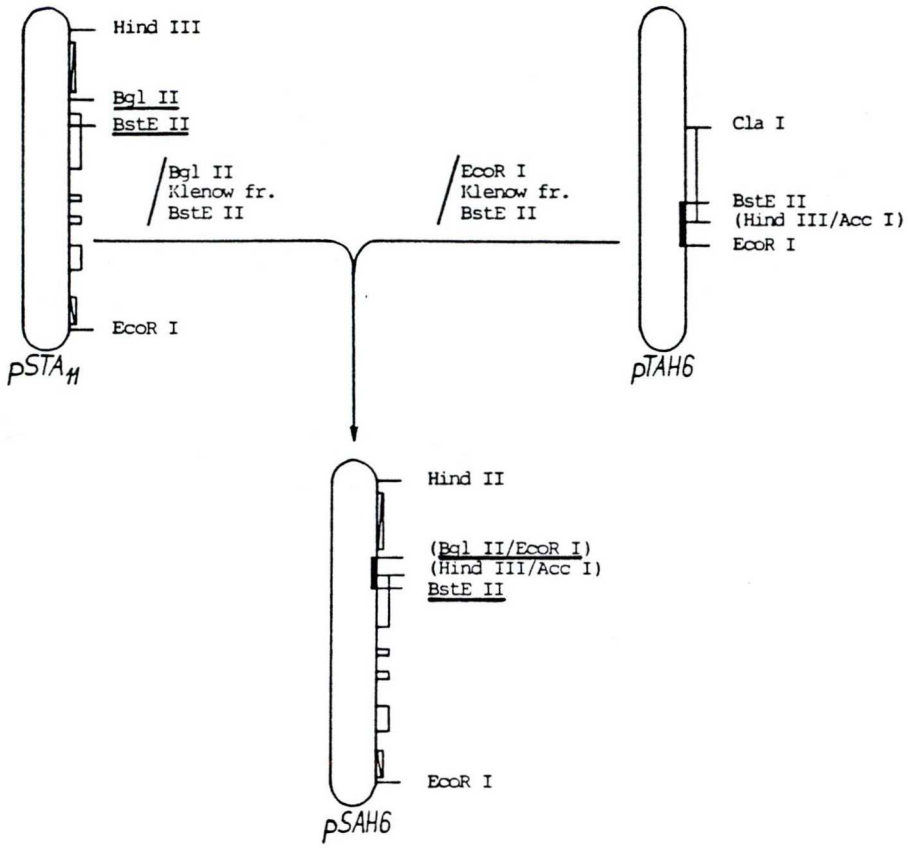


16. ábra: "**A**" klónozási út: transzlációs stop szignál létrehozása a 26 kD TNF 81. aminosavának kodonja után

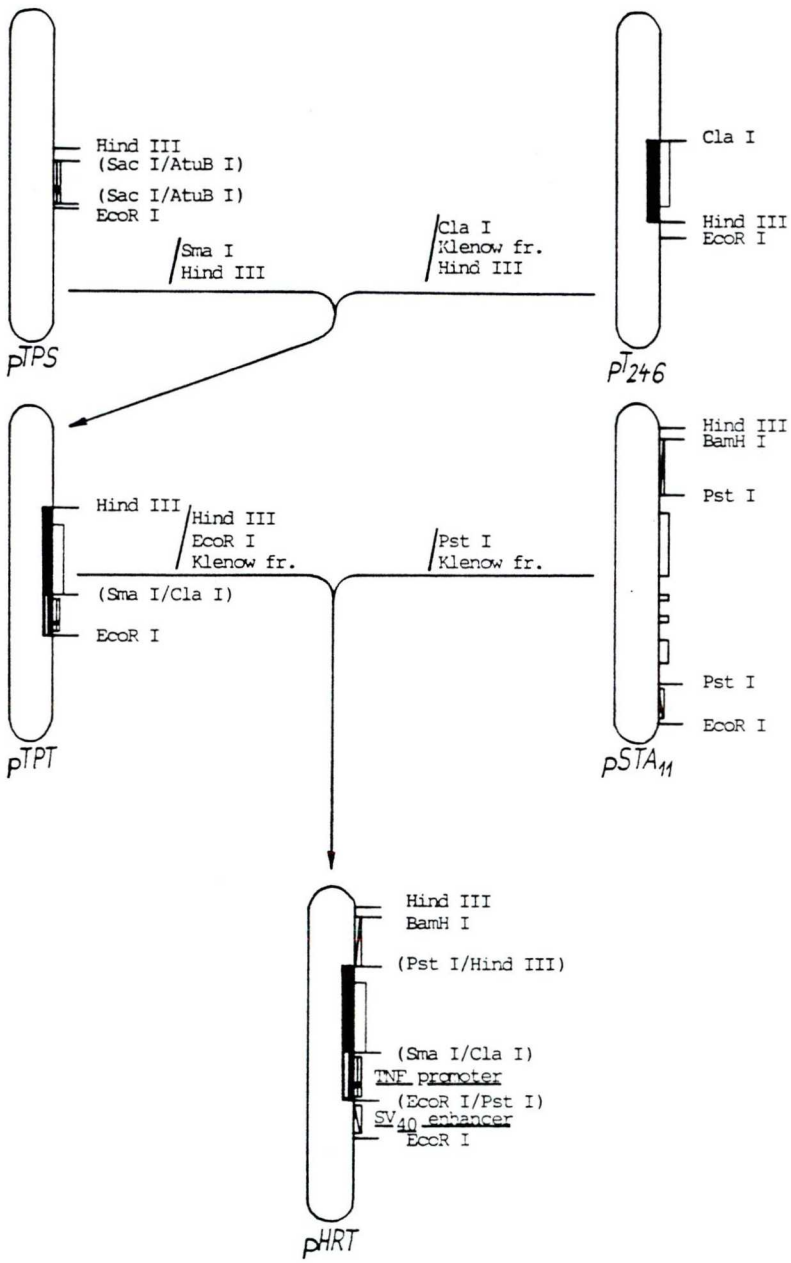
A pTΔIX plazmidot (pTΔIX = a XbaI hely átklónozva pT_{246}-ból pSPSA-ba a III. exon kiejtésével) XbaI-gyel részlegesen emésztettük (kettős aláhúzás), majd feltöltés (Klenow fr.) után ligázzal zártuk. Ezzel létrehoztunk egy transzlációs terminációs szignált (Term.) a 81. aminosav kodonja után.

"**B**" klónozási út: Az rhTNF gén delécióinak átvitele eukarióta expressziós vektorban működő TNF génbe

A XbaI-gyel emésztett (aláhúzás) pTΔIX plazmidot feltöltöttük, és ligázzal zártuk. Ezzel a lépéssel lényegesen megkönnyítettük a deléciókat hordozó XbaI-BstEII fragmentek klónozását az eukarióta vektorban lévő TNF génbe, XbaI-BstEII helyre.



17. ábra: A C-terminális deléció átvitele rhTNF génből eukarióta TNF génbe
A C-terminális deléciót hordozó BstEII-EcoRI fragmentet (sötét vastagítás) $pSTA_{11}$ BstEII-BglII helyére építettük be az EcoRI és a BglII vágóhelyek feltöltésével (aláhúzások).

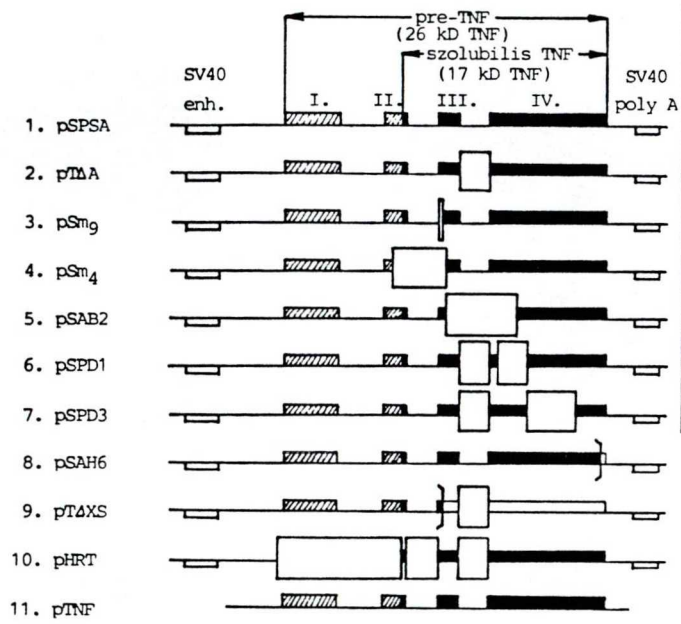


18. ábra: A rhTNF gén beépítése eukarióta expressziós vektorba

A rhTNF gént (sötét vastagítás) beépítettük a humán TNF-promóter mögé, majd a $pSTA_{11}$-ben lévő hTNF gént PstI-gyel kivágtuk, és helyére a TNF-promóterrel rendelkező rhTNF gént építettük be. Az így kapott pHRT a rekombináns TNF-t kódolja.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 13.

A jobb áttekinthetőség érdekében a 19. ábrán összefoglaltuk az L929 sejtek transzformációjára felhasznált lényegesebb konstrukciók fő jellemzőit. Az ábrán feltüntettük a deléciók méretét is, mind a kódoló bázisokat, mind az érintett aminosavakat tekintve.



	DELÉCIÓK		KONVERZIÓK
	bázisok	aminosavak	
1. pSPSA	—	—	—
2. pTΔA	—	—	—
3. pSm9	233. $\overset{(3)}{-}$ 235.	78.(Arg)	79.Ser→Thr
4. pSm4	199. $\overset{(51)}{-}$ 249.	67.(Asp) $\overset{(17)}{-}$ 83.(Thr)	66.Arg→Ser
5. pSAB2	254. $\overset{(87)}{-}$ 340.	85.(Ser) $\overset{(29)}{-}$ 113.(Leu)	114.Ala→Thr
6. pSPD1	304. $\overset{(66)}{-}$ 369.	102.(Leu) $\overset{(22)}{-}$ 123.(Gln)	—
7. pSPD3	370. $\overset{(234)}{-}$ 603.	124.(Leu) $\overset{(78)}{-}$ 201.(Gln)	—
8. pSAH6	Transzl. stop jel a 226.(Val) kodon után		
9. pTΔXS	Transzl. stop jel a 81.(Ser) kodon után		
10. pHRT	Rek. h.TNF gén		
11. pTNF	SV40 enhancer és poly A nélküli TNF gén		

19. ábra: Az L929 sejtek transzformálására felhasznált leglényegesebb konstrukciók sematikus képe és főbb jellemzői

A széles üres négyszögek a gén delécióit jelzik. I., II., III., IV. a gén kódoló szekvenciáinak (exonok) a száma. A táblázatrészben a zárójelben lévő számok a deletált bázispárok ill. a deletált aminosavak mennyiségét jelzik, míg a ponttal lezárt számok a deléció végeinek pozícióit (a DNS esetében csak a kódoló szekvencia bázisait számoztuk).

EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A rhTNF gén klónozása, expressziója E. coliban.

A humán TNF gén négy exonja közé három intron ékelődik be. Munkánk kezdetekor a kutatási eredmények azt mutatták, hogy az úgynevezett érett TNF (17 kD, szolubilis forma) kódja a második exon utolsó bázispárjaitól indul, és a negyedik exon végén terminálódik (1,100,109,110,122,139), tehát két intron szakítja meg. Ez az egyik oka annak, hogy a gén baktériumban ebben a formájában nem expresszáltatható (a másik kizáró ok a kezdő metionin kodon hiánya).

Az intronok eltávolítását egy 96 bázispáros szintetikus DNS-fragment beépítésével oldottuk meg, amelyben két bázispárt megváltoztattunk úgy, hogy az eredeti aminosavsorrend nem változott. Ezzel három új restrikciós enzim vágóhelyet alakítottunk ki a rhTNF gén 5' vége közelében, amik a későbbi génmanipulációs munkákat jelentősen megkönnyítették. A fragment a kezdő metionint is kódolja.

Az így kialakított génszakaszt bakteriális expressziós vektorba építettük be, amely megfelelő promótert és klónozó szekvenciát (polylinker) tartalmaz bakteriális ill. bakteriális jellegű gének kifejezésére (95).

A termelt 17 kD-os fehérjét közel homogenitásig tisztítottuk, és in vivo (Nagy Sándor és mtrsai, SZOTE Kísérleti Sebészeti Klinika), ill. in vitro kísérletekben vizsgáltuk. Tulajdonságai mind in vivo, mind in vitro megegyeztek az irodalomban leírt rhTNF-évei.

A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy sikerült a rhTNF-t E. colival nagy mennyiségben termeltetnünk (155), továbbá az a tény, hogy a termelést nem szükséges indukálni, nagymértékben csökkentette az előállítás költségeit.

A konstitutív génműködést feltehetően a lac operátor mutációja okozta, amire abból következtethettünk, hogy a plazmid minden általunk használt E. coli törzsben azonos módon működött, tehát az ok nem lehetett represszormutáció.

A rhTNF módosítása, a muteinek aktivitása

Mint azt már bevezetőnkben is említettük, a rhTNF rendkívül toxikus in vivo rendszerekben, ami klinikai alkalmazhatóságát erősen beszűkíti (114), ezért különböző módosításokkal próbáltuk elérni, hogy káros mellékhatásait csökkentsük.

Kísérleteinket arra a feltevésre alapoztuk, hogy a TNF receptorkötését és aktivitását vagy toxicitását a molekula különböző szekvenciái határozzák meg, és az aktivitásért vagy toxicitásért felelős szekvencia eliminálható a receptorkötő sajátság megőrzése mellett, azaz előállítható lenne a rhTNF-ből TNF-antagonista. Ezért deléciókat hoztunk létre az N-terminális közelében, a molekula belsejében és C-terminálisán.

A kísérletek másik része arra irányult, hogy különböző polipeptidláncok N-terminálishoz történő hozzákapcsolásával sztérikusan gátoljuk a TNF aktív, trimer formájának kialakulását.

Azonban sem a deléciók, sem a peptidfúziók nem vezettek a kívánt eredményre. Minden delécios rhTNF-mutein inaktívnak bizonyult, ami nem mond ellent a közben mások által közölt eredményeknek és adatoknak, amennyiben rövid deléciók az N-terminális közelében - ahova a receptorkötő helyeket térképezték (22,143) - illetve a C-terminálison (138) szintén inaktiválták a TNF-t. Mint az a későbbiek során a különböző fajok TNF-szekvenciájának összehasonlításából kiderült, a mások által és az általunk deletáltatott régiókban az 50 %-ot is meghaladja azoknak az aminosavaknak az aránya, amelyek azonosak a humán, a macska (103), disznó (37), birka (170), egér és nyúl TNF-ben (53), tehát invariábilisnek tekinthetők. Általában az invariábilis régiókban történt mutációk nagyságrendekkel csökkentették az aktivitást, kivéve az N-terminális első 10 aminosavának delécióját (54), illetve az N-terminális bázicitásának fokozását, ami a TNF aktivitását többszörösére növelte (145). Wang és munkatársai szerint ugyancsak kivételt képez a diszulfidhidat alkotó két cystein kicserélése (99), ami ellentmond Narachi és munkatársai által közölt eredményeknek, miszerint a csere csökkenti a TNF aktivitását (108). Utóbbi hihetőbb, ha figyelembe vesszük, hogy az eddig vizsgált összes TNF-ben jelen van a diszulfidhíd, ami feltehetően a konformáció stabilizálásában játszik szerepet.

Az általunk és mások által a rhTNF-fel végzett génmanipulációs kísérletekből nyert, valamint a rhTNF szerkezetéről az irodalomban talált adatok azt a feltevést sugallják, hogy minden olyan módosítás, amely a ß-szendvics szerkezet megbomlásá-

hoz vagy a trimer kialakulásának gátlásához vezet, csökkenti, vagy megszünteti a TNF receptor-affinitását ill. aktivitását (10,37,53,54,75,103,170).

Génmanipulációs módszerekkel tehát nem sikerült TNF-antagonistát előállítanunk: a TNF-aktivitást nem mutató muteinek egyike sem kompetált a TNF-fel a TNF-receptorokhoz való kötődésben.

Ami viszont újdonságnak számít eredményeinkben:

1. fúziós TNF-mutein előállítása,

2. ß-galaktozidáz- és TNF-aktivitás egy fehérjéhez kötve,

3. minden olyan fúziós TNF-mutein, amely egy teljes rhTNF-szekvenciát is tartalmaz, megőrizte TNF-aktivitását.

A fúzióban résztvevő peptidek (α-peptid, deléciós TNF ill. TNF-ek) nem befolyásolják a TNF in vitro aktivitását annak N-terminálisával fej-láb kapcsolódásban, tehát nem akadályozzák meg sem a trimer kialakulását, sem a receptorokhoz való kötődést. Ennek valószínűleg az lehet a magyarázata, hogy az N-terminális első 8-10 aminosava nem vesz részt a ß-szendvics felépítésében, és nincs szerepe a trimer stabilizálásában sem (75). Flexibilitása folytán a hozzákapcsolt polipeptid szabadon elmozdulhat, így nem tudja megakadályozni sem a trimerizációt sem a receptorkötést.

4. A fémkötő TNF előállításával olyan mutein birtokába jutottunk, amelynek keringési féléletideje hosszabb, mint a rhTNF-é, míg biológiai aktivitása azonos a rhTNF-évcl. A keringési féléletidő növekedése feltehetően annak a következménye, hogy az N-terminálison létrehozott aminosavcserék nehezebben hozzáférhetővé tették a muteint az inaktiváló faktorok számára.

Természetes hTNF klónozása és expressziója HeLa sejtekben

Az a tény, hogy a szövetkultúrákban husszú ideig fenntartható sejtvonalak nem, vagy csak igen kis mennyiségben (néhány ezer egység/ml) termelnek TNF-t (30,38, 111), egyrészt túlságosan megdrágítja a kísérleteket természetes hTNF-fel - aminek toxicitása sokkal alacsonyabb a rhTNF-énél (114) -, másrészt nagyon megnehezítené muteinek genetikai úton történő előállítását, és nyomonkövetését. Ezért a hTNF gént egy eukarióta expressziós vektorba építettük be egy erős enhancer

(SV40) és egy poly A szignál (szintén SV40) közé. Az ezzel a plazmidkonstrukcióval ($pSTA_{11}$) transzformált HeLa sejtek között jó TNF-termelő ($2x10^5$ egység/ml) klónokat is találtunk. Szinte azonos eredményeket kaptak Korn és munkatársai, akik CHO sejteket transzformáltak TNF génnel nagyon hasonló konstrukcióban (82).

A termelt TNF a sejtek felülúszójából izolálható volt, tisztítási procedúrája, mol.súlya, in vitro hatása azonos a rhTNF-évl, azonban in vivo toxicitása sokkal gyengébbnek bizonyult (Duda Ernő és munkatársai; nem publikált adatok), amire elfogadhatónak tűnik Old magyarázata: az emlős sejt preperátumok endotoxinmentesek, és a TNF N-terminálisáról hiányzik a valószínűleg szintén toxikus formil-metionin (114).

Az in vivo toxicitás jelentős csökkenése a természetes humán TNF-t egyrészt alkalmasabbá teheti a klinikai alkalmazásra a rekombináns hTNF-nél. Másrészt a természetes hTNF endotoxin- és formil-metionin-mentessége TNF-fel végzett kísérletekben nagyobb esélyt biztosíthat pontosabb következtetések levonására.

A természetes hTNF módosítása, membránkötött TNF előállítása

Decker és munkatársai vetették fel először sejtfelszínhez kötött TNF termelődésének valószínűségét (32), amivel - bár elfogadható bizonyítékokat csak két évvel később közöltek (94) - a TNF-ről alkotott kép megváltozott: valószínűvé vált, hogy az addig szignálpeptidnek tekintett 76 aminosav funkciója a TNF sejtmembránhoz történő rögzítése a makrofágok felszínén. A 157 aminosavas szolubilis forma enzimes hasítással jön létre ebből a membránkötött fehérjéből (84,94). Ezért olyan genetikai módosításokat hoztunk létre a TNF génben, amelyekkel a fehérjén a feltételezett enzim hasítóhelyét kívántuk megszüntetni, hogy megakadályozzuk a szolubilis forma kialakulását, előállítva a TNF membránkötött formáját további vizsgálatokra alkalmas mennyiségben.

Két ilyen konstrukciónk közül a hosszabb, 17 aminosavas deléciót hordozó Sm_4 mutein nem mutatott TNF-aktivitást, ami feltehetően abban rejlik, hogy egyrészt a deléció eliminálta a ß-szendvicseket megelőző flexibilis régiót, másrészt a deléció következtében a fehérje túlságosan mélyen beágyazódik a membránba, így az enzimes hasítás, illetve a receptorkötés és/vagy a trimer forma kialakulása sztérikusan

gátolt (20. ábra).

Az egy aminosav deléciót és konverziót hordozó Sm_9 mutein azonban aktív volt. A szolubilis forma kialakulása gátolt, aminek következtében a TNF-aktivitás nagy része sejthez kötött maradt.

Azt a feltevésünket, hogy a muteinünk membránkötött, a következő adatok támasztják alá:

1. Találtunk olyan klónokat, amelyeknek felülúszójából nem, de sejtjeiből sikerült TNF-aktivitást kimutatni.

Perez és munkatársainak is (kiterjedtebb deléciókat létrehozva) sikerült olyan sejteket izolálniuk, amelyek csak membránkötött TNF-t termeltek, és ezek a sejtek a TNF-érzékenyeket csak sejt-sejt kontaktusban voltak képesek elpusztítani (123). Ez a mechanizmus a makrofágokra jellemző, és talán a későbbiek során felhasználható lesz a klinikumban is.

2. Az Sm_9 muteint termelő sejtek TNF-aktivitása több, mint két nagyságrenddel meghaladta a felülúszójuk TNF-aktivitását (míg a természetes TNF-t termelő sejteknél a felülúszó aktivitása volt nagyságrendekkel magasabb a sejtekénél).

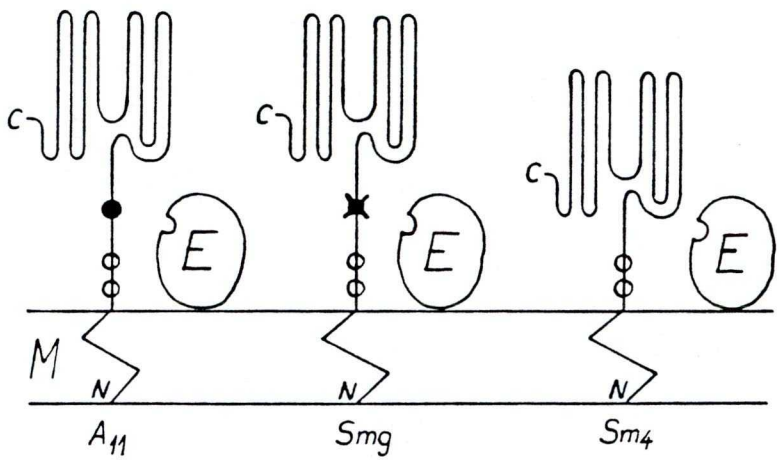
3. Az Sm_9 muteint termelő sejteknek nagyságrendekkel nagyobb volt a TNF-aktivitása, mint a szolubilis formát termelőké.

4. A homogenizált sejteknek csak a membrán frakciójában találtunk TNF-aktivitást.

5. A szolubilizált Sm_9 mutein inaktív volt, hasonlóan a Kriegler és munkatársai által leírt, in vitro szintetizált 26 kD formához (84).

6. A szolubilizált Sm_9 mutein liposzóma-membránba ültetve visszanyerte aktivitásának nagy részét (Duda Ernő és munkatársai; nem közölt adatok) hasonlóan Kriegler és munkatársai által közölt eredményekhez, ahol az in vitro szintetizált inaktív pre-TNF (26 kD forma) mikroszóma frakció hozzáadásával aktívvá vált (84).

Arra nézve, hogy a kapott sejtvonalak többségénél miért találhattunk TNF-t a sejtek felülúszójában is, az tűnik elfogadható magyarázatnak, hogy a szolubilis forma különböző aminosavak mentén hasadhat le a sejtfelszínről (28,107), és konstrukcionkban olyan rövid deléciót hoztunk létre, hogy az az alternatív vágóhelyeket nem érintette, és a trimerizációt vagy receptorkötést sem gátolta (20. ábra).



20. ábra: A természetes hTNF-nek és muteinjeinek általunk feltételezett elrendeződésének sémája a sejtfelszínen.
Az Sm_4 fehérje alternatív vágóhelyeinek hasítása (és valószínűleg a receptorkötés is) sztérikusan gátolt, míg az Sm_9 alternatív vágási helyei hozzáférhetőek.
A sötét kör a preferált, a világos körök az alternatív vágóhelyeket jelölik. **A_{11}**: természetes TNF, **Sm_9**: aktív mutein (membránkötött TNF), **Sm_4**: inaktív mutein, **E**: enzim, **M**: sejtmembrán, **C**: C-terminális, **N**: N-terminális.

Rezisztencia-vizsgálatok L_{929} sejtekben

Nophar és munkatársai TNF-rezisztens és TNF-érzékeny sejtek fúziója során azt tapasztalták, hogy a sejtfúziót követően minden esetben a TNF-rezisztencia dominált (112), Hahn és munkatársai (és mások) pedig azt, hogy a TNF alacsony dózisa több TNF-érzékeny sejtvonal esetében TNF-rezisztenciát vált ki (60,69,83,148,163).
Hudziak és munkatársai onkogénekkel transzformáltak TNF-érzékeny sejteket, amik a transzformálást követően TNF-rezisztensekké váltak, és ha ezeket egy másik onkogénnel transzformálták, újra szenzitívek lettek (70).
Chen és munkatársai E1A onkogénnel transzformáltak TNF-rezisztens NIH3T3 sejteket, és azok TNF-érzékenyekké váltak (29).
Gooding és munkatársai szerint az adenovírus E3 régiójáról átíródó fehérje a NIH3T3 sejtekben TNF-rezisztenciát vált ki (56).

Fenti adatok ismeretében kézenfekvőnek tűnt a kérdés, hogy a TNF génnel ill. a mutáns TNF génekkel transzformált TNF-érzékeny sejtek rezisztensekké válnak-e.

A kísérletekhez a rendkívül érzékeny L_{929} sejtvonalat használtuk, amit a természetes hTNF-t kódoló plazmiddal ($pSTA_{11}$, pSPSA) transzformáltunk, és TNF-rezisztens klónokat kaptunk. Ezek nemcsak rezisztensek voltak, hanem TNF-termelők is egyben, ami szelekciós előnyhöz juttatta a klónokat azáltal, hogy a termelt TNF elpusztította a tenyészet TNF-érzékeny sejtjeinek nagy részét. Ugyanakkor a nem működő TNF génnel (pTNF) transzformált sejtek között nem találtunk TNF-rezisztenst vagy TNF-termelőt. A kísérletet megismételtük pSm_9, aktív TNF-muteint kódoló plazmiddal, ami szintén kiváltotta a TNF-rezisztenciát, és inaktív TNF-muteineket kódoló plazmidokkal, amelyek hatására nem jött létre rezisztencia az L_{929} sejtekben (4. táblázat). Nem sikerült rezisztenciát kiváltani a szolubilis formát (rhTNF) kódoló gén transzformációjával sem, ami a természetes hTNF N-terminálisának fontosságára utal: a leader-funkciót betöltő és membránkötésért felelős peptidszakasz eliminálása miatt a TNF nem juthat a sejtfelszínre, és nem találkozhat a TNF-receptorokkal.

Fenti eredményeink arra engednek következtetni, hogy a TNF gén által L_{929} sejtekben kiváltott rezisztenciáért a TNF-aktivitással rendelkező, sejtfelszínre jutó géntermék a felelős.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során kitűzött céljaink legnagyobb részét sikerült megvalósítanunk:

Előállítottuk a humán rekombináns TNF-t nagy mennyiségben, kis anyagköltséggel, laboratóriumi körülmények között. A fehérje tulajdonságai megegyeztek az irodalmi adatokkal, így az a további kísérleti munkákra alkalmasnak bizonyult.

Nem sikerült előállítanunk TNF-antagonistát a rhTNF-ből, ami feltehetően arra vezethető vissza, hogy a TNF-aktivitást elimináló mutációk csökkentették, vagy megszüntették a muteinek receptoraffinitását.

Előállítottunk fúziós TNF-muteineket, amire nem találtunk utalást az irodalomban. A fúziós muteinek megőrizték TNF-aktivitásukat, ill. az egyik fúziós peptid megőrizte mind a ß-galaktozidáz-, mind a TNF-aktivitását.

Létrehoztunk a rhTNF-nél hosszabb keringési féléletidejű muteint, amelynek in vitro aktivitása azonos volt a rhTNF-évl, in vivo aktivitása azonban nagyobb volt a rhTNF-énél.

A természetes hTNF nagy mennyiségben, emlős sejtekkel történő termeltetésével olyan TNF birtokába jutottunk, amelynek in vivo toxicitása sokkal kisebb, mint a rhTNF-é, míg in vitro aktivitása azonos azzal. Ez a fehérje lehetőséget biztosíthat a klinikai alkalmazási terület bővítésére ill. a TNF-kísérletek adatainak pontosítására.

Génmanipuláció segítségével sikerült megakadályoznunk a TNF sejtmembránról történő lehasadását szövetkultúrás kísérletekben. Ezzel olyan TNF-muteint kunstruáltunk, amely csak membránhoz kötődve mutatott TNF-aktivitást.

Sikerült TNF-érzékeny sejteket TNF-rezisztensekké és TNF-termelőkké tennünk aktív TNF-t kódoló gének bevitelével, ugyanakkor nem sikerült TNF-rezisztenciát kiváltanunk inaktív TNF-t kódoló génekkel, ami azt a feltevést sugallja, hogy a transzformációval kiváltott TNF-rezisztenciáért a TNF-aktivitást mutató géntermék a felelős.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is köszönetet mondok **Dr. Duda Ernőnek** a szakmai irányításért és segítségért, valamint azért, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését. **Dr. Gyuris Jenőnek, Dr. Kálmán Miklósnak, Lukácsovich Tamásnak** és **Munkatársainak** továbbá **Dr. Tóth Miklósnak** azokért a plazmidokért, amelyeket voltak szívesek rendelkezésemre bocsájtani. **Szilák Lászlónak** az oligomerek elkészítéséért. **Galiba Ferencnének** a szövettenyésztésben végzett megbízható, pontos munkájáért és sok segítségéért. Továbbá **Kollégáimnak**, akik információik és tapasztalataik átadásával segítettek munkám során.

IDÉZETT IRODALOM

1 Human tumor necrosis factor
B.B.Aggarwal, W.J.Kohr, P.E.Hass, B.Moffat, S.A.Spencer, W.J.Henzel, T.S.Bringman, G.E.Nedwin, D.A.Goeddel and R.N.Harkins
J.B.C.260:2345-2354,1985

2 Effect of phorbol esters on down-regulation and redistribution of cell surface receptors for tumor necrosis factor-∝
B.Aggarwal and T.E.Eessalu
J.B.C.262:16450-16455,1987

3 Molecular weight of recombinant human tumor necrosis factor-∝
T.Arakawa and D.A.Yphantis
J.B.C.262:7484-7485,1987

4 Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28
A.-P.Arrigo
M.C.B.10:1276-1280,1990

5 Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition
C.Baglioni, S.McCandless, J.Tavernier, and W.Fiers
J.B.C.260:13395-13397,1985

6 Cytocidal activity of tumor necrosis factor: protection by protease inhibitors
C.Baglioni, V.Ruggerio, K.Latham and S.E.Johnson
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 52-63,1987

7 Effects of tumor necrosis factor on human tumour xenografts in nude mice
F.R.Balkwill, B.G.Ward and W.Fiers
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 154-169,1987

8 Tumor necrosis factor as an anticancer agent
F.R.Balkwill, M.S.Naylor and S.Malik
Eur.J.Cancer 26:641-644,1990

9 Sendai virus induces high levels of tumor necrosis factor mRNA in human peripheral blood leukocytes
S.L.Berent, R.M.Torczynski and A.P.Bollon
N.A.R.14:8997-9015,1986

10 Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors
D.R.Bertolini, G.E.Nedwin, T.S.Bringman, D.D.Smith & G.R.Mundy
Nature 319:516-518,1986

11 Identity of tumor necrosis factor and macrophage-secreted factor cachectin
B.Beutler, D.Greenwald, J.D.Hulmes, M.Chang, Y.-C.E.Pan, J.Mathison, R.Ulevitch and A.Cerami
Nature 316:552-554,1985

12 Purification of cachectin, a lipoprotein lipase supressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW264.7 cells
B.Beutler, J.Mahoney, N.L.Trang, P.Pekala and A.Cerami
J.Exp.Med.161:984-995,1985

13 Passive immunisation against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin
B.Beutler, I.W.Milsark, A.C.Cerami
Science 229:869-871,1985

14 Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo
B.A.Beutler, I.W.Milsark, and A.Cerami
J.Immunol.135:3972-3997,1985

15 Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin
B.Beutler & A.Cerami
Nature 320:584-588,1986

16 Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance
B.Beutler, N.Krochin, I.W.Milsark, C.Luedke, A.Cerami
Science 232:977-980,1986

17 Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator
B.Beutler, and A.Cerami
Ann.Rev.Biochem.57:505-518,1988

18 The history, properties and biological effects of cachectin
B.Beutler, and A.Cerami
Biochemistry 27:7575-7582,1988

19 Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-∝
D.A.Brenner, M.O'Hara, P.Angel, M.Chojkier, & M.Karin
Nature 337:661-663,1989

20 Virus-vs endotoxin-induced activation of liver macrophages
K.J.Busam, A.Homfeld, R.Zawatzky, S.Kastner, J.Bauer, W.Gerok, and K.Decker
Eur.J.Biochem.191:577-582,1990

21 Tumor necrosis factor stimulates human neutrophils to release leukotriene B_4 and platelet-activating factor
G.Camussi, C.Tetta, F.Bussolino and C.Baglioni
Eur.J.Biochem.182:661-666,1989

22 Use of a sensitive receptor binding assay to discriminate between full-length and truncated human recombinant tumor necrosis factor proteins
J.A.Carlino, L.S.Lin, and A.A.Creasey
J.B.C.262:958-961,1987

23 An endotoxin-induced factor that causes necrosis of tumors
E.A.Carswell, L.J.Old, R.L.Kassel, S.Green, N.Fiore and B.Williamson
P.N.A.S.72:3666-3670,1975

24 Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kB -like motifs and costitutive and inducible forms of NF-kB
M.A.Collart, P.Bauerle, and P.Vassalli
Mol.Cell.Biol.10:1498-1506,1990

25 Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro
T.Collins, L.A.Lapierre, W.Fiers, J.L.Strominger, and J.S.Pober
P.N.A.S.83:446-450,1986

26 The growth factor-like effects of tumor necrosis factor-∝
P.Cornelius, M.Marlowe, M.D.Lee, and P.H.Pekala
J.B.C.265:20506-20516,1990

27 A high molecular weight component of the human tumor necrosis factor receptor is assotiated with cytotoxicity
A.A.Creasey, R.Yamamoto, and C.R.Vitt
P.N.A.S.84:3293-3297,1987

28 Alternative cleavage of the cachectin/tumor necrosis factor propeptide results in a larger, inactive form of secreted protein
K.Cseh and B.Beutler
J.B.C.264:16256-16260,1989

29 Induction by E1 A oncogene expression of cellular susceptibility to lysis by TNF
M.-J.Chen, B.Holskin, J.Strickler, J.Gorniak, M.A.Clark, P.J.Johnson, M.Mitcho and D.Shalloway
Nature 330:581-583,1987

30 Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes
M.C.Cuturi, M.Murphy, M.P.Costa-Giomi, R.Weinmann, B.Perussia, and G.Trinchieri
J.Exp.Med.165:1581-1594,1987

31 Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E_2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts
J.-M.Dayer, B.Beutler, and A.Cerami
J.Exp.Med.162:2163-2168,1985

32 Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages
T.Decker, M.-L.Lohmann-Matthes, and G.E.Gifford
J.Immunol.183:957-962,1987

33 c-fos and tumor necrosis factor gene expression in Leishmania donovani-infected macrophages
A.Descoteaux and G.Matlashewski
M.C.B.9:5223-5227,1989

34 Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1
C.A.Dinarello, J.G.Cannon, S.M.Wolff, H.A.Berheim, B.Beutler, A.Cerami, I.S.Figari, M.A.Palladino, J.V.O'Connor
J.Exp.Med.163:1433-1450,1986

35 Biology of interleukin-1
C.A.Dinarello
FASEB J.2:108-115,1988

36 Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor receptors in response to bacterial lipopolysaccharide
A.H.Ding, E.Sanchez, S.Srimal, and C.F.Nathan
J.B.C.264:3924-3929,1989

37 Gene sequence of porcine tumor necrosis factor alpha
R.T.Drews, B.W.Coffee, A.K.Prestwood and R.A.McGraw
N.A.R.18:5564,1990

38 Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor
D.B.Dubravec, D.R.Spriggs, J.A.Mannick, and M.L.Rodrick
P.N.A.S.87:6758-6761,1990

39 Tumor-necrosis factor ∝ activates human immunodeficiency virus type I through induction of nuclear factor binding to the NFkB sites in the long terminal repeat
E.J.Duh, W.J.Maury, T.M.Folks, A.S.Fauci, and A.B.Rabson
P.N.A.S.86:5974-5978,1989

40 Genetic analysis of the human tumor necrosis factor ∝ /cachectin promoter region in a macrophage cell line
J.Economou, K.Roades, R.Essner, W.H.McBride, J.C.Gasson, and D.L.Morton
J.Exp.Med.170:321-326,1989

41 Tumor necrosis factor induced DNA fragmentation of HL-60 cells
L.Elias, P.B.Moore and S.M.Rose
B.B.R.C.157:963-969,1988

42 A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity
H.Engelmann, D.Aderka, M.Rubinstein, D.Rotman and D.Wallach
J.B.C.264:11974-11980,1989

43 Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity
H.Engelmann, H.Holtmann, C.Brakebusch, Y.S.Avni, I.Sarov, Y.Nophar, E.Hadas, O.Leiter and D.Wallach
J.B.C.265:14497-14504,1990

44 Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine
H.Engelmann, D.Novick, and D.Wallach
J.B.C.265:1531-1536,1990

45 Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor
T.Espevik, M.Brockhaus, H.Loetscher, U.Nonstad, and R.Shalaby
J.Exp.Med.171:415-426,1990

46 Lymphokines and monokines in anti-cancer therapy
W.Fiers, P.Brouckaert, R.Devos, L.Fransen, G.Leroux-Roels, E.Remant, P.Suffys, J.Tavernier, J.van Der Heyden, and F.van Roy
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.LI:587-609,1986

47 Structure-function relationship of tumor necrosis factor and its mechanism of action
W.Fiers, P.Brouckaert, A.L.Goldberg, I.Kettelhut, P.Suffys, J.Tavernier, B.Vanhaesebroeck and F.van Roy
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 109-123,1987

48 A family of angiogenic peptides
J.Folkman and M.Klagsbrun
Nature 329:671-672,1987

49 Tumor necrosis factor type ∝, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo
M.Frater-Schröder, W.Risau, R.Hallmann, P.Gautschi, and P.Böhlen
P.N.A.S.84:5277-5281,1987

50 Protective effect of chlorpromazine on endotoxin toxicity and TNF production in glucocorticoid -sensitive and glucocorticoid-resistant models of endotoxin shock
M.Gadina, R.Bertini, M.Mengozzi, M.Zandalasini, A.Montavani, and P.Ghezzi
J.Exp.Med.173:1305-1310,1991

51 Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients
T.Gatanaga, C.Hwang, W.Kohr, F.Cappuccini, J.A.Lucci, E.W.B. Jeffes, R.Lentz, J.Tomich, R.S.Yamamoto, and G.A.Granger
P.N.A.S.87:8781-8784,1990

52 Enhancement of in vivo immune response by tumor necrosis factor
P.Ghiara, D.Boraschi, L.Nencioni, P.Ghezzi, and A.Tagliabue
J.Immunol.139:3676-3679,1987

53 Tumor necrosis factors: gene structure and biological activity
D.V.Goeddel, B.B.Aggarwal, P.W.Gray, D.W.Leung, G.E.Nedwin, M.A.Palladino, J.S.Patton, D.Pennica, H.M.Shepard, B.J.Sugarman, and G.H.W.Wong
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.LI:587-595,1986

54 Structural and functional domains in human tumor necrosis factors
C.R.Goh and A.G.Porter
Protein Engineering 4:385-389,1991

55 Coordinate viral induction of tumor necrosis factor ∝ and interferon ß in human B cells and monocytes
A.E.Goldfeld and T.Maniatis
P.N.A.S.86:1490-1494,1989

56 A 14,700 Mw protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor
L.R.Gooding, L.W.Elmore, A.E.Tollefson, H.A.Brady, and W.S.M.Wold
Cell 53:341-346,1988

57 Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor
R.G.Goodwin, D.Anderson, R.Jerzy, T.Davis, C.I.Brannan, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, and C.A.Smith
Mol.Cell.Biol.11:3020-3026,1991

58 Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-∝/cachectin
J.R.Gordon and S.J.Galli
Nature 346:274-276,1990

59 A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
F.L.Graham, and A.J.van der Eb
J.Virol.52:456-457,1973

60 Use of monoclonal antibodies to a human cytotoxin for its isolation and for examining the self-induction of resistance to this protein
T.Hahn, L.Toker, S.Budilovsky, D.Aderka, Z.Eshhar, and D.Wallach
P.N.A.S.82:3814-3818,1985

61 Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway
J.Han, P.Thopson and B.Beutler
J.Exp.Med.172:391-394,1990

62 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids
D.Hanahan
J.Mol.Biol.166:557-580,1983

63 Antitumor effects of tumor necrosis factor: cytotoxic or necrotizing activity and its mechanism
K.Haranaka, N.Satomi, A.Sakurai and R.Haranaka
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 140-153,1987

64 Analysis of TNF involvement in tumor hemorrhagic necrosis and regression induced by Poly I:C or endotoxin
E.A.Havell and R.J.North
In: The Biology of the Interferon System 1988
Eds: Y.Kawade and S.Kobayashi
Kodansha Sci.Ltd.Tokyo,1989

65 Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells
L.Helson, S.Green, E.Carswell, L.J.Old
Nature 258:731-732,1975

66 Modulation of tumor necrosis factor-∝ cytotoxicity in L_{929} cells by bacterial toxins, hydrocortisone and inhibitors of arachidonic acid metabolism
A.Hepburn, J.-M.Boeynaems, W.Fiers and J.E.Dumont
B.B.R.C.149:815-822,1987

67 Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF∝)
H.-P.Hohmann, R.Remy, M.Brockhaus, and A.P.G.M.van Loon
J.B.C.264:14927-14934,1989

68 Tumor necrosis factors-∝ and -ß bind to the same two types of tumor necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF-kB at low receptor occupancy and within minutes after receptor binding
H.-P.Hohmann, R.Remy, B.Pöschl, and A.P.G.M.van Loon
J.B.C.265:15183-15188,1990

69 Interrelated effects of tumor necrosis factor and interleukin 1 on cell viability
H.Holtmann, T.Hahn, and D.Wallach
Immunobiol.17:7-22,1988

70 Amplified expression of the HER_2/ErBB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor in NIH3T3 cells
R.M.Hudziak, G.D.Lewis, M.R.Shalaby, T.E.Eessalu, B.B.Aggarwal, A.Ulrich, and M.Shepard
P.N.A.S.85:5102-5106,1988

71 Expression of tumor necrosis factor receptors on human monocytes and internalization of receptor bound ligand
K.Imamura, D.Spriggs, and D.Kufe
J.Immunol.139:2989-2992,1987

72 TNF stimulates expression of mouse MHC classI genes by inducing an NFkB-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors
A.Israel, O.L.Bail, D.Hatat, J.Piette, M.Kieran, F.Logeat, D.Wallach, M.Fellous and P.Kourilsky
The EMBO J.8:3793-3800,1989

73 Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metallo-proteinases (TIMP) production by human fibroblasts
A.Ito, T.Sato, T.Iga and Y.Mori
FEBS Lett.269:93-95,1990

74 Antiviral activity of tumor necrosis factor: Interactions with interferons
H.Jacobsen, J.Mestan, C.W.Dieffenbach
In:The Biology of the Interferon System 1988
Eds: Y.Kawade and S.Kobayashi
Kodansha Sci.Ltd.Tokyo 1989

75 The structure of tumor necrosis factor - implications for biological function
E.Y.Jones, D.I.Stuart
J.Cell Sci.Suppl.13:11-18,1990

76 Effect of IFN-ß on the productions of tumor necrosis factor and andogenous pyrogen endotoxin -fever in rabbits
H.Kawasaki, M.Moriyama, Y.Ohtani, M.Naitoh, A.Tanaka, and H.Nariuchi
In:The Biology of the Interferon System 1988
Eds: Y.Kawade and S.Kobayashi
Kodansha Sci.Ltd.Tokyo 1989

77 Effect of tumor necrosis factor ∝ on mitogen-activated human B cells
J.H.Kehrl, A.Miller, and A.S.Fauchi
J.Exp.Med.166:786-791,1987

78 The inducing role of tumor necrosis factor in the develop ment of bacterial granulomas during BCG infection
V.Kindler, A.-P.Sappino, G.E.Grau, P.-F.Piquet, and P.Vassalli
Cell 56:731-740,1989

79 Mechanism of human lymphotoxin and tumor necrosis factor induced destruction of cells in vitro: phospholipase activation and deacylation of specific membrane-phospholipids
M.F.Knauer, K.J.Longmuir, R.S.Yamamoto, T.P.Fitzgerald, and G.A.Granger
J.Cell.Physiol.142:469-479,1990

80 Induction of $ß_2$-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation
M.Kohase, D.Henriksen-DeStefano, L.T.May, J.Vilcek and P.B.Sehgal
Cell 45:659-666,1986

81 A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occuring tumor necrosis factor inhibitor
T.Kohno, M.T.Brewer, S.L.Baker, P.E.Schwartz, M.W.King, K.K.Hale, C.H.Squires, R.C.Thompson, and J.L.Vannice
P.N.A.S.87:8331-8335,1990

82 Cloning of genomic DNA for tumor necrosis factor and efficient expression in CHO cells
J.H.Korn, Y.Mory, A.Ziberstein, H.Holtmann, M.Revel, and D.Wallach
Lymphokine Res.7:349-358,1988

83 **Induction of hyporesponsiveness to an early post-binding effect of tumor necrosis factor by tumor necrosis factor itself and interleukin 1**
M.König,D.Wallach, K.Resch and H.Holtmann
Eur.J.Immunol.21:1741-1745,1991

84 **A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF**
M.Kriegler, C.Perez, K.DeFay, I.Albert, and S.D.Lu
Cell 53:45-53,1988

85 **Cellular receptor for ^{125}I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity**
F.C.Kull, S.Jakobs, and P.Cuatrecasas
P.N.A.S.82:5756-5760,1985

86 **Growth-promoting effect of recombinant interleukin 1 and tummor necrosis factor for a human astrocytoma cell line**
L.B.Lachman, D.C.Brown, and C.A.Dinarello
J.Immunol.138:2913-2916,1987

87 Cleavage of structural proteins during assambly of the head of bacteriophage T4
U.K.Laemmli
Nature 227:680-685,1970

88 Enhancement of tumor necrosis factor synthesis by interferon in AIDS
A.S.Lau and J.F.Livesey
In:The Biology of the Interferon System 1988
Eds: Y.Kawade and S.Kobayashi
Kodansha Sci.Ltd.Tokyo 1989

89 Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts
T.H.Lee, G.W.Lee, E.B.Ziff, and J.Vilcek
Mol.Cell.Biol.10:1982-1988,1990

90 Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor-α
S.J.Leibovich, P.J.Polverini, H.M.Shepard, D.M.Wiseman, V.Sively & N.Nuseir
Nature 329:630-632,1987

91 Tumor necrosis factor and interleukin-I cause a rapid and transient stimulation of c-fos and c-myc mRNA levels in human fibroblasts
J.-X.Lin and J.Vilcek
J.B.C.262:11908-11911,1987

92 Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor
H.Loetscher, Y.-C.E.Pau, H.-W.Lahm, R.Gentz, M.Brockhaus, H.Tabuchi, and W.Lesslauer
Cell 61:351-359,1990

93 Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptor from HL60 cells
H.Loetscher, E.J.Schlaeger, H.-W.Lahm, Y.-C.E.Pau, W.Lesslauer, and M.Brockhaus
J.B.C.265:20131-20138,1990

94 Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor
B.Luetting, T.Decker and M.-L. Lohmann-Matthes
J.Immunol.143:4034-4038,1989

95 A family of expression vectors based on the rrnB P_2 promoter of Escherichia coli
T.Lukacsovich, A.Orosz, G.Baliko and P.Venetianer
J.Biotech.16:49-56,1990

96 A simple and rapid method for the preparation of plasma membranes
T.Maeda, K.Balakrishnan and S.Q.Mehdi
B.B.A.731:115-120,1983

97 Természetes emberi tumor necrosis factor előállítása
Mai A., Duda E., Tóth M., Galiba E.
Magyar szabadalom; Szab.szám 2030/90, 1990

98 Tumor necrosis factor prekurzort tartalmazó készítmény előállítása
Mai A., Duda E., Galiba E., Fejes M.
Szabadalmi eljárás alatt, 1991

99 Site-specific mutagenesis to modify the human tumor necrosis factor gene
D.F.Mark, A.Wang, and C.Levenson
Meth.Enzymol.154:403-414,1987

100 Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor
A.Marmenout, L.Fransen, J.Tavernier, J.Van Der Heyden, R.Tizard, E.Kawashima, A.Shaw, M.-J Johnson, D.Semon, R.Müller, M.-R.Ruysschaert, A.Van Vliet and W.Fiers
Eur.J.Biochem.152:515-522,1985

101 Anti-tumor cytotoxin produced by human monocytes: studies on its mode of action
N.Matthews
Br.J.Cancer 48:405-410,1983

102 Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor ∝ in renal allograft rejection
C.P.J.Maury and A.-M.Teppo
J.Exp.Med.166:1132-1137,1987

103 Gene sequence of feline tumor necrosis factor alpha
R.A.McGraw, B.W.Coffee, C.M.Otto, R.T.Drews and C.A.Rawlings
N.A.R.18:5563,1990

104 Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro
J.Mestan, W.Digel, S.Mittnacht, H.Hillen, D.Blohm, A.Möller, H.Jacobsen, and H.Kirchner
Nature 323:816-819,1986

105 Tumor necrosis factor increases in vivo glucose utilization of macrophage-rich tissues
K.Mészáros, C.H.Lang, G.J.Bagby and J.J.Spitzer
B.B.R.C.149:1-6,1987

106 Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
R.Munker, J.Gasson, M.Ogawa and H.P.Koeffler
Nature 323:79-82,1986

107 Synthesis and maturation of recombinant human tumor necrosis factor in eukaryotic systems
R.Müller, A.A.Marmenout, W.Fiers
FEBS Lett.197:99-104,1986

108 Role of single disulfide in recombinant human tumor necrosis factor-∝
M.A.Narachi, J.M.Davis, Y.-R.Hsu, and T.Arakawa
J.Biol.Chem.262:13107-13110,1987

109 Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF-∝) and lymphotoxin (TNF-ß) in the human genome
S.A.Nedospasov, A.N.Shakov, R.L.Turetskaya, V.A.Mett, M.M..Azizov, G.P.Georgiev, V.G.Korobko, V.N.Dobrynin, S.A.Filippov, N.S.Bystrov, E.F.Boldyreva, S.A.Chuvpilo, A.M.Chumakov, L.N.Shingarova, and Y.A.Ovchinnikov
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.LI:611-624,1986

110 Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization
G.E.Nedwin, S.L.Naylor, A.Y.Sakaguchi, D.Smith, J.Jarett- Nedwin, D.Pennica, D.V.Goeddel and P.W.Gray
N.A.R.13:6361-6373,1985

111 Effect of interleukin-2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors ∝ and ß
G.E.Nedwin, L.P.Svedersky, T.S.Bringman, M.A.Palladino, and D.V.Goeddel
J.Immunol.135:2492-2497,1985

112 Dominance of resistance to the cytocidal effect of tumor necrosis factor in heterokaryons formed by fusion of resistant and sensitive cells
Y.Nophar, H.Holtmann, R.Ber, and D.Wallach
J.Immunol.140:3456-3460,1988

113 Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock
K.Ohlsson, P.Björk, M.Bergenfeldt, R.Hageman & R.C.Thompson
Nature 348:550-552,1990

114 Tumor necrosis factor (TNF)
L.J.Old
Science 230:630-632,1985

115 Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice
A.Oliff, D.Defeo-Jones, M.Boyer, D.Martinez, D.Kiefer, G.Voucolo, A.Wolfe and S.H.Socher
Cell 50:555-563,1987

116 The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia
A.Oliff
Cell 54:141-142,1988

117 The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor ∝ encodes a novel type of zinc finger protein
A.W.Opipari, M.S.Boguski, and V.M.Dixit
J.B.C.265:14705-14708,1990

118 Tumor necrosis factor ∝ and interleukin I stimulate the human immundeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kB
L.Osborn, S.Kunkel, and G.J.Nabel
P.N.A.S.86:2336-2340,1989

119 Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation
L.Osborn
Cell 62:3-6,1990

120 Possible relationships between in vivo antitumor activity and toxicity of tumor necrosis factor
M.A.Palladino, J.S.Patton, I.S.Figari and M.R.Shalaby
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 21-38,1987

121 Selective inhibition of synthesis of enzymes for de novo fatty acid biosynthesis by an endotoxin-induced mediator from exudate cells
P.H.Pekala, M.Kawakami, C.W.Angus, M.D.Laue, and A.Cerami
P.N.A.S.80:2743-2747,1983

122 Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin
D.Pennica, G.E.Nedwin, J.S.Hayflick, P.H.Seeburg, R.Derynck, M.A.Palladino, W.J.Kohr, B.B.Aggarwal & D.V.Goeddel
Nature 312:724-729,1984

123 A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills cell-to-cell contact
C.Perez, I.Albert, K.DeFay, N.Zachariades,L.Gooding, and M.Kriegler
Cell 63:251-258,1990

124 Tumor necrosis factor ∝ regulates expression of the major histocompatibility complex Class II-associated invariant chain by binding of an NF-kB-like factor to a promoter element
U.Pessara and N.Koch
M.C.B.10:4146-4154,1990

125 Antiparasitic effects of tumor necrosis factor in vivo and in vitro
J.H.L.Playfair and J.Taverne
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 192-205,1987

126 Effects of tumor necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells
J.S.Pober
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 170-184,1987

127 Interleukin 6 induces Human Immunodeficiency Virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor ∝ by transcriptional and post-transcriptional mechanisms
G.Poli, P.Bressler, A.Kinter, E.Duh, W.C.Timmer, A.Rabson, J.S.Justement, S.Stanley, and A.S.Fanci
J.Exp.Med.172:151-158,1990

128 Tumor necrosis factor ∝ /cachectin and interleukin I ß initiate meningeal inflammation
O.Ramilo, X.Sáez-Llorens, J.Mertsola, H.Jafari, K.D.Olsen, E.J.Hansen, M.Yoshinaga, S.Ohkawara, H.Nariuchi, and G.H.McCracken
J.Exp.Med.172:497-507,1990

129 Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein
M.J.Rindler, S.S.Naik, N.Li, T.C.Hoops, and M.-N.Peraldi
J.B.C.265:20784-20789,1990

130 Molecular Cloning
A laboratory manual
J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Maniatis
Ed: C.Nolan
CSH Lab.Press,1989

131 Purification and characterization of a human tumor necrosis factor
B.Y.Rubin, S.L.Anderson, S.A.Sullivan, B.D.Williamson, E.A.Carswell, and L.J.Old
P.N.A.S.83:6637-6641,1985

132 Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor
T.J.Schall, M.Lewis, K.J.Koller, A.Lee, G.C.Rice, G.H.W.Wong, T.Gatanaga, G.A.Granger, R.Lentz, H.Raab, W.J.Kohr, and D.V.Goeddel
Cell 61:361-370,1990

133 Tumor necrosis factor: an update on basic research and clinical applications
M.Schleuning and R.Munker
Klinische Wochenschrift 68:841-846,1990

134 DNA fragmentation: Manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant
D.S.Schmid, J.P.Tite, and N.H.Ruddle
P.N.A.S.83:1881-1885,1986

135 Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor ∝ inhibitor
P.Seckinger, S.Isaaz, and J.-M.Dayer
J.B.C.264:11966-11973,1989

136 kB-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor ∝ gene in primary macrophages
A.E.Shakhov, M.A.Collart, P.Vassalli, S.A.Nedospasov, and C.V.Jongeneel
J.Exp.Med.171:35-47,1990

137 A novel tumor necrosis factor-responsive transcription factor which recognizes a regulatory element in hemopoietic growth factor genes
M.F.Shannon, L.M.Pell, M.J.Lenardo, E.S.Kuczek, F.S.Occhiodoro, S.M.Dunn, and M.A.Vadas
Mol.Cell.Biol.10:2950-2959,1990

138 Tumor necrosis factor analogs: identification of functional domains
R.S.Shidu and A.P.Bollon
Anticancer Res.9:1569-1576,1989

139 Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor
T.Shirai, H.Yamaguchi, H.Ito, C.W.Todd and B.Wallace
Nature 313:803-806,1985

140 Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to Schistosoma mansoni larvae
D.S.Silberstein and J.R.David
P.N.A.S.83:1055-1059,1986

141 Protective effects of tumor necrosis factor on murine hematopoiesis during cycle-specific cytotoxic chemotherapy
L.Slordal, D.J.Warren, and M.A.S.Moore
Cancer Res.50:4216-4220,1990

142 Tumor necrosis factor ∝ /cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium
A.Slungaard, G.M.Vercelotti, G.Walker, R.D.Nelson, and H.S.Jacob
J.Exp.Med.171:2025-2041,1990

143 Antibodies against amino acids 1-15 of tumor necrosis factor block its binding to cell-surface receptor
S.H.Socher, M.W.Riemen, D.Martinez, A.Friedman, J.Tai, J.C.Quintero, V.Garsky, and A.Oliff
P.N.A.S.84:8829-8833,1987

144 Tumor necrosis factor ∝ inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts
J.A.Solis-Herruzo, D.A.Brenner, and M.Chojkier
J.B.C.263:5841-5845,1988

145 Improvement of cytotoxicity of tumor necrosis factor (TNF) by increase in basicity of its N-terminal region
G.-I.Soma, N.Kitahara, Y.Tsuji, M.Kato, H.Oshima, T.Gatanaga, H.Inagawa, K.Noguchi, Y.Tanabe, and D.Mizuno
B.B.R.C.148:629-635,1987

146 Inhibition of insulin secretion by interleukin-I ß and tumor necrosis factor ∝ via L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism
C.Southern, D.Schulster and I.C.Green
FEBS Lett.276:42-44,1990

147 Subunit interactions and the function of tumor necrosis factor
S.R.Sprang, M.J.Eck
Preprint from Current Res. in Protein Chemistry
Ed: J.Villafranca; Acad.Press,1990

148 Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line
D.Spriggs, K.Imamura, C.Rodriguez, J.Horiguchi, and D.W.Kufe
P.N.A.S.84:6563-6566,1987

149 Clinical studies with tumor necrosis factor
D.A.Spriggs, M.L.Sherman, E.Frei III and D.W.Kufe
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 206-227,1987

150 Tumor necrosis factor and immune interferon act in concert to slow the lateral diffusion of proteins and lipids in human endothelial cell membranes
A.H.Stolpen, D.E.Golan, and J.S.Pober
J.Cell Biol.107:781-789,1988

151 Reduced tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism
P.Suffys, R.Beyaert, F.V.Roy and W.Fiers
B.B.R.C.149:735-743,1987

152 Recombinant human tumor necrosis factor -α: effects on ploriferation of normal and transformed cells in vitro
B.J.Sugarman, B.B.Aggarwal, P.E.Hass, I.S.Figari, M.A.Palladino, H.M.Shepard
Science 230:943-945,1985

153 Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses
B.Thoma, M.Grell, K.Pfizenmaier, and P.Scheurich
J.Exp.Med.172:1019-1023,1990

154 A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia
F.M.Torti, B.Dieckmann, B.Beutler, A.Cerami, G.M.Ringold
Science 229:867-868,1985

155 Rekombináns emberi tumor necrosis factor előállítása
Tóth M., Duda E., Mai A., Nielsen, K.
Magyar szabadalom; Szab.szám 5578/88, 1988

156 Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin
K.J.Tracey, B.Beutler, S.F.Lowry, J.Merryweather, S.Wolpe, I.W.Milsark, R.J.Hariri, T.J.Fahey III, A.Zentella, J.D.Albert, G.T.Shires, A.Cerami
Science 234:470-474,1986

157 Physiological responses to cachectin
K.J.Tracey, S.F.Lowry and A.Ceramy
In: Tumor necrosis factor and related cytotoxins
Wiley,Chichester (CIBA Foundation Symp.131) p 88-108,1987

158 Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation
K.J.Tracey, H.Wei, K.R.Manogue, Y.Fong, D.G.Hesse, H.T.Nguyen, G.C.Kuo, B.Beutler, R.S.Cotran, A.Cerami, and S.F.Lowry
J.Exp.Med.167:1211-1227,1988

159 Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells
M.Tsujimoto, Y.K.Yip, and J.Vilcek
P.N.A.S.82:7626-7630,1985

160 Colony-stimulating factor 1 expression is down-regulated during the adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells and induced by cachectin/tumor necrosis factor
A.Umezawa, K.Tachibana, K.Harigaya, S.Kusakari, S.Kato, Y.Watanabe, and T.Takano
Mol.Cell.Biol.11:920-927,1991

161 Downregulation of tumor necrosis factor (TNF) sensitivity via modulation of TNF binding capacity by protein kinase C activators
R.Unglaub, B.Maxeiner, B.Thoma, K.Pfizenmaier, and P.Scheurich
J.Exp.Med.166:1788-1797,1987

162 Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodelling
H.Vlassara, M.Brownlee, K.R.Manogue, C.A.Dinarello, A.Pasagian
Science 240:1546-1548,1988

163 Sensitization and desensitization to lethal effects of tumor necrosis factor and IL-1
D.Wallach, H.Holtmann, H.Engelmann, and Y.Nophar
J.Immunol.140:2994-2999,1988

164 Modulation of endogenous hormone action by recombinant human tumor necrosis factor
R.S.Warren, D.B.Donner, H.F.Starnes, Jr., and M.F.Brennan
P.N.A.S.84:8619-8622,1987

165 Tumor necrosis factor is a compact trimer
P.Wingfield, R.H.Pain and S.Craig
FEBS Lett.211:179-184,1987

166 Tumor necrosis factor and ß inhibit virus replication and synergize with interferons
G.H.W.Wong & D.V.Goeddel
Nature 323:819-822,1986

167 Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor
G.H.Wong, J.H.Elwell, L.W.Oberley, and D.V.Goeddel
Cell 58:923-931,1989

168 Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-∝
S.Yokota, T.D.Geppert, and P.E.Lipsky
J.Immunol.140:531-536,1988

169 A cell-killing monoclonal antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor
S.Yonehara, A.Ishii, and M.Yonehara
J.Exp.Med.169:1747-1756,1989

170 Primary structure of ovine tumor necrosis factor alpha cDNA
A.J.Young, J.B.Hay and J.Y.C.Chan
N.A.R.18:6723,1990

171 Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuklear factor binding to a kB-like sequence
Y.Zhang, J.-X.Lin, and J.Vilcek
M.C.B.10:3818-3823,1990

172 Model for mammalian metallothionein structure
Y.Boulanger, C.M.Goodman, C.P.Forte, S.W.Fesik, and I.M.Armitage
P.N.A.S.80:1501-1505,1983