

- ences reflected in function? *Brain Res Rev*, 1989; **14**:203
- 2 Delgado-Escueta A V, White R, Greenberg D A *et al.* *Advances in Neurology*, New York: Raven Press, 1986; **44**:203
 - 3 Albin R L, Young A B, Penny J B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 1989; **12**:366
 - 4 Leidenheimer N J, Browning M, Harris R A. GABA_A receptor phosphorylation multiple sites action and artifacts. *TIPS*, 1991; **12**:84
 - 5 Wagstaff J, Knoll J H M, Fleming J *et al.* Localization of the gene encoding the GABA_A receptor β_3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *Am J Hum Genet*, 1991; **49**:330
 - 6 Schofield P R, Darlison M G, Fujita N *et al.* Sequence and functional expression of the GABA_A receptor show a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 1987; **328** (16):221
 - 7 Levitan E S, Schofield P R, Burt D R *et al.* Structural and functional basis for GABA_A receptor heterogeneity. *Nature*, 1988; **335**(1):76
 - 8 Khrestchatisky M, MacLennan A J, Tillakaratne N J K *et al.* Sequence and regional distribution of the mRNA encoding the α_2 polypeptide of rat γ -aminobutyric acid_A receptors. *J Neurochem*, 1991; **56**(5):1717
 - 9 Ymer S, Schofield P R, Draguhn A *et al.* GABA_A receptor β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA differential expression of γ -aminobutyric acid_A receptor subunits. *The EMBO J*, 1989; **8**(6):1665
 - 10 Garrett K M, Saito N, Duman R S *et al.* Differential expression of γ -aminobutyric acid_A receptor subunits. *Mol Pharmacol*, 1990; **37**:652
 - 11 Bateson A N, Lasham A, Darlison M G. Gamma-aminobutyric acid_A receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel β_3 -subunit gene transcript. *J Neurochem*, 1991; **56**(4):1437
 - 12 Park D, de Blas A L. Peptide subunits of γ -aminobutyric acid_A/benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 1989; **338**:582
 - 13 Dean M, Lucas-Derse S, Bolos A *et al.* Genetic mapping of the GABA receptor gene to human chromosome 4, using a tetranucleotide repeat polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1991; **49**:621
 - 14 Pritchett D B, Sontheimer H, Shivers B D *et al.* Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 1989; **338**:582
 - 15 Ymer S, Draguhn A, Wisden W *et al.* Structural and functional characterization of the γ_1 subunit of GABA_A/benzodiazepine receptor. *EMBO J*, 1990; **9**(10):3261
 - 16 Kofuji P, Wang J B, Moss S J *et al.* Generation of two forms of the γ -aminobutyric acid_A receptor γ_2 -subunit in mice by alternative splicing. *J Neurochem*, 1991; **56**(2):713
 - 17 Sommer B, Keinänen K, Verdoorn T A *et al.* Flip and flop: a cell specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 1990; **249**:1580
 - 18 Goyal R K. Muscarinic receptor subtypes. *New Eng J Med*, 1989; **321**(15):1022
 - 19 Valerio A, Tinti C, Spano P F *et al.* Rat pituitary cells selectively express mRNA encoding the short isoform of the γ_2 GABA_A receptor subunit. *Mol Brain Res*, 1992; **13**:145

肿瘤坏死因子结构研究进展

万晓余 吴淑华

(中国预防医科院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室, 100052)

提 要

肿瘤坏死因子是 α -肿瘤坏死因子和淋巴毒素的统称, 它们具有相同的细胞受体。国内外学者在阐明人肿瘤坏死因子三级结构的基础上, 结合使用化学修饰, 抗

体结构域定位、定点诱变等方法对人肿瘤坏死因子结构与其功能的关系进行了研究,确定了人肿瘤坏死因子分子中对其活性至关重要的部位,同时也基本阐明了人 α -肿瘤坏死因子的受体结合位点的氨基酸组成以及它们在人肿瘤坏死因子三、四级结构上的位置。

关键词 肿瘤坏死因子, 蛋白质结构, 结构与功能的关系

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是两类结构和功能相关的细胞因子 α -肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和淋巴毒素 (lymphotoxin, LT) 的统称。TNF- α 是由激活的巨噬细胞所产生的细胞因子, 其最明显的特征就是在体内外特异性杀伤某些肿瘤细胞而对正常组织细胞无明显毒性作用。而 LT 是抗原或促细胞分裂剂刺激 T 细胞所分泌的淋巴因子。由于二者的结构上的同源性及功能上的相似性, 前者被命名为 TNF- α 后者为 TNF- β 。研究表明, 肿瘤坏死因子除了具有特异性杀伤肿瘤细胞的作用以外, 它还在免疫调节、抗病毒、代谢调控、造血及炎症前反应等方面发挥重要的作用^[1], 作为一种潜在的抗肿瘤药物, 人 TNF- α (hTNF- α) 已进入临床试验。目前一般认为, hTNF- α 和人 LT (hLT) 是通过结合到其共同的受体而发挥其效应的^[1], 因而 hTNF/hLT 的特异性结构构成了它们与细胞间信号传导的关键因素。为此, 国内外科学家应用不同的手段, 从各个方面对 hTNF 的结构及其结构与功能的关系进行了深入的研究并取得了重大进展, 从而为利用基因工程和蛋白质工程技术改造 hTNF 分子以用于临床提供了坚实的理论基础。本文将对上述领域中近年来的一些重大进展作一介绍。

1 人肿瘤坏死因子的基因结构及蛋白质分子一级结构

hTNF- α 基因组结构与 hTNF- β (LT) 极为相似, 其基因组 DNA 均为 3kb 长, 包括由 3 个内含子间隔的 4 个外显子, 两者基因连锁定位于人第 6 号染色体的 6q23—6q12u 区, 显示在进化来源上有一定的相关。TNF- α 和 TNF- β 在核苷酸序列上较少同源 (约 30%), 而其内含

子区同源性则更低; 但二者最后一个外显子 (此外显子编码 TNF 和 LT 多肽 80% 以上的氨基酸序列) 却有 56% 以上的同源, 显示此外显子可能来自同一始祖^[2]。尽管如此, hTNF 和 hLT 的氨基酸序列还是有明显的不同^[3], hTNF 有一个二硫键, 无甲硫氨酸残基, 而 hLT 无半胱氨酸残基却含 3 个甲硫氨酸, 且有一个天冬氨酸连接的糖基化位点。TNF- α 和 TNF- β 都是以前体的形式被合成, hLT 前体有一个典型的信号肽序列, hTNF- α 前体有一个 76 个氨基酸的信号肽, 成熟的 TNF- α 去掉这一引导肽, 由 157 个氨基酸组成, 分子量约 17.35kD, 其分子中不存在糖基化位点, 因此它以非糖基化多肽的形式被分泌出来; 而天然 hLT 则是糖基化蛋白, 在其 62 位氨基酸上有一个 N-糖基化位点, 但非糖基化的重组 hLT 的活性并不受影响。

2 肿瘤坏死因子蛋白质分子高级结构

活体内发现的 TNF 分子量往往从 34 000 到 40 000 不等, 于是人们便设想这可能是由于 TNF 分子中的两个半胱氨酸可能会形成分子间二硫键, 从而形成多聚体。后来的研究表明, TNF 在溶液中是一个紧密的三聚体^[4], 圆二色谱和旋光色散研究结果表明 TNF 是一个非螺旋的富含 β 折叠的蛋白^[5]。利用 2.9 Å 和 2.6 Å 分辨率的 X-射线衍射分析表明^[6,7], 具有生物学活性的天然 TNF 分子为三聚体, 其分子的每一个亚基由两个反平行 β 折叠所组成, 单个的亚基通过 β 折叠的边对面堆积方式形成三聚体。与其它蛋白相比, TNF 三聚体的亚基堆积与病毒衣壳蛋白的“卷饼”结构极为相似。而且它和几种病毒尤其是烟草坏死卫星病毒的衣壳蛋白在结构上具有惊人的同源性。

虽然 hTNF- α /hLT 在结构和功能上相互关联,但它们在三级结构上却存在差异,这一点明显地表现在两者对于各种理化条件的敏感性的差异上,例如,对于去污剂、有机溶剂和酸等, hTNF 相当稳定而 hLT 则非常敏感;相反,对于不同的蛋白酶, hTNF 非常敏感而 hLT 则相当稳定^[8].

3 肿瘤坏死因子结构与功能的关系

对于肿瘤坏死因子结构与功能关系的研究,人们的兴趣主要集中于 hTNF- α ,只有少数几个研究小组在 *E. coli* 中获得了 hLT (hTNF- β) 的高表达^[2,9]. 但由于二者之间的高度同源性,人们在研究 hTNF 结构与功能关系时,往往要将二者作一比较.

3.1 hTNF 分子 N 端结构与功能的关系

分别缺失 hTNF- α 和 hLT N 端的 7 个和 24 个氨基酸可使它们在体外的细胞毒活性增加 2—6 倍,从 hTNF- α 和 hLT 的 N 端分别缺失 9 个和 25 个氨基酸后两者的生物学活性都不丧失^[10,11]. 这表明 hTNF- α 和 hLT N 端的 9 个和 hLT N 端的 25 个氨基酸虽非其功能所必需,但它们在某些方面能够调节修饰 hTNF- α 和 hLT 的生物学活性. hTNF- α 的 N 端游离于分子三级结构的表面,因此它可对近旁的受体结合区域有轻微的干扰作用^[6,7]. 令人惊奇的是,经纯化的缺失 N 端 24 个氨基酸的 hLT 突变体与其母体相比,其在体外的细胞毒活性升高 2 倍而对小鼠的致死率却降低 5 倍^[12],目前还不清楚这种缺失是否能在体内加剧肿瘤的坏死,而其在体内毒性降低的机理也不甚明了,然而这些结果却为我们改造 hTNF 以用于肿瘤治疗提供一种有益的思路.

3.2 TNF 分子 C 端结构与功能的关系

hLT 的疏水性 C 端对于其生物学活性是至关重要的. 缺失其 C 端 10 个氨基酸可导致 hLT 生物学活性的完全丧失^[13]. hTNF- α 中高度同源的 C 端序列形成一段折叠并嵌合在另外两段 β 折叠之间^[6], 这些 β 折叠和相邻亚基的 β 片层发生非共价作用从而稳定其三级结

构,对该部位进行缺失和置换都会引起 hTNF- α 生物学活性的下降.

3.3 氨基酸替换对 hTNFs 生物学活性的影响

hTNF- α 和 hLT 中单个氨基酸的替换可对其生物学活性产生不同的影响,且 hTNF- α /hLT 中保守和非保守的氨基酸的替换都能对 hTNF- α 的活性产生影响. 虽然那些其替换可改变 hTNF- α 活性达 20 倍的氨基酸在其他物种的 TNF 分子中是极为保守的,但 hTNF- α 分子中至少有 6 个氨基酸对其生物学功能是非必需的,而这 6 个氨基酸在目前已知的其他物种的 TNF- α /LT 分子中也是完全保守的^[14],而相对地说上述保守的氨基酸残基主要集中在分子的内部,因而它们一般不参与蛋白分子的活性位点;同样, hTNF- α 分子中连接 69 位和 101 位的唯一的二硫键桥以及在 hTNFs 分子中保守的两个 Tyr 都不参与其分子的活性中心,但上述保守位点在维持 hTNFs 的三级结构中却是至关重要的.

在 hTNF- α 分子中, 15, 31—35, 84—87, 117—119 及 143—148 位氨基酸的替换可以引起 hTNF 生物学活性的明显下降. hTNF- α 分子中 31—35 位氨基酸位于或靠近分子三聚体的表面,同时也靠近重要的 N 端区域,因此它们可能参与受体的识别和生物学反应的启动. 由于 34 位的 Asn 替换为 Tyr 可导致其细胞毒性下降 10 000 倍而受体结合亲和力仅有稍微的降低,因而可以推测 hTNF- α 分子中的 Asn34 参与启动生物学反应^[15]. hTNF- α 分子中, Arg32 $\rightarrow$ Trp/Thr, Leu36 $\rightarrow$ Phe, Ser86 $\rightarrow$ Phe 及 Ala84 $\rightarrow$ Val 等几个位点的突变可使 TNF 的活性完全丧失,而对带有上述突变的 hTNF 蛋白进行不同的理化测试表现出与野生型蛋白相同的性质. 上述残基在 hTNF 的三维结构模型上定位后发现,在 TNF 三聚体中它们都聚集在两个单体之间所形成的“V”形槽两侧的基部. 上述位点中一个十分保守的突变 (Ala84 $\rightarrow$ Val) 可使突变体的细胞毒活性几乎完全丧失. 在临近受体结合位点的其他 3 个残

基中的 29 位和 146 位残基上引入非保守性突变 (Leu29→Ser, Glu146→Lys) 仅能明显降低细胞受体结合活性而对其生物学活性无影响, 提示它们对于受体结合位点仅有间接的作用。然而 91 位上的保守性突变 (Val→Ala) 则可使突变体的生物学活性下降 500 倍, 从而提示 Val91 对于受体识别有直接的影响^[16]。

值得注意的是^[17], 分子中位于亲水环区保守的 Asp50 的替换可使其细胞毒活性和受体结合活性大大降低, 而对位于亲水环区的 Tyr108 的替换同样也能产生上述效应, 提示 Asp50 和 Tyr108 对于 TNF- β 的受体结合及细胞毒活性都是必需的。hLT 分子中其他有意义的突变是 Lys84 和 Lys89 之间的 6 个氨基酸的缺失^[17], 这一缺失可以增强 hLT 对鼠细胞和人腺癌细胞系的细胞毒活性, 显然这与提高受体结合亲和力是相关的。由于 Lys84 是参与与单克隆抗体结合的抗原决定簇的一部分, 同时 Lys89 也是 hLT 分子中唯一对胰蛋白酶敏感的残基^[3], 因此可以断定, 84—89 位的残基一定位于 hLT 的表面。已知的证据也表明 hLT 的 84—89 位残基参与调节受体结合。

hTNF- α 分子中有 3 个 His 残基, 但只有 15 位的 His 对其生物学活性是重要的。用 Asn, Lys 或 Gly 替换 His15 皆可使 hTNF- α 的活性丧失, 而由 His→Gln 的突变可降低其活性至母体的 10—15%。His15 位于 hTNF- α 分子中的一个 β 片层的中部, 而这些氨基酸的替换可能打断这一 β 片层。化学修饰研究表明了游离的 His15 的重要性, 利用焦碳酸二乙酯在 His15 上特异性引入乙酰基可导致 hTNF- α 活性的明显下降, 由于 His15 正好位于 TNF 分子表面的下部且靠近重要的 31—35 位氨基酸区和 N 端, 因此可以推测 His15 可能与受体结合位点发生作用^[18]。

此外, 117—119 位氨基酸残基位于 hTNF- α 分子两个亚基之间的表面上, 因而可能参与三聚体中亚基之间的相互作用。84—87 和 143—148 位残基位于形成 β 转角的环区, 而该区域是 hTNF- α 三聚体表面所有环状结构中最

为暴露的部分^[6]。

表 1 氨基酸改变对 hTNFs 活性的影响

突 变	细胞毒活性比 (突变体/母体)
淋巴毒素(hLT)	
缺失 K84 到 K89 氨基酸	10—1000
缺失 N 端 24 个氨基酸	3.0
Q146R ¹⁾ , H150Y, T26N, D50N	0.5—1.0
缺失 C 端 10 个氨基酸	0
肿瘤坏死因子(hTNF- α)	
缺失 N-端 2 个和 7 个氨基酸	3.0—7.0
L157Q	5.0
R131Q, R138L, D140K	1.0
L36I, V50M, T72Y, P100H	0.5—1.0
L120Q, S133I, A134T, L157M	同上
A18V, A38V, L75P, V91I, S99N	0.05—0.5
T105P, Y115C, A145V, I155L	同上
W28F, W144F, H73Q, H78Q	0.25—0.42
C69S, C69A, C101S, C101A, C101L	0.05—1.0
H15Q	0.1—0.15
A35H, R31N 和 R32T(双突变)	0.02—0.05
A33T, N34Y, P117L, Y119H, E146K	0.0001—0.01
S147C, G148E, S86F	同上
R32E, A84D, Y87H	0.0001
H15N, H15K, H15G, A84H, D143Y	0

1) Q146R 表示 146 位 Glu 突变为 Arg, 以下同。

4 hTNFs 的受体结合位点

利用合成多肽诱导产生的抗体进行的实验支持了这样一种观点, 即受体结合结构域可能靠近 hTNF- α 的 N 端^[18]。在受体结合检测试验中, 代表了 hTNF- α 所有结构域的多肽不能与 TNF- α 竞争与其受体的结合, 同时也不具备细胞毒和脂蛋白脂酶(LPL)抑制活性, 在针对这些合成肽的抗血清中, 只有针对完整的 hTNF- α 分子和 hTNF- α (1—15)及 hTNF- α (1—31)合成肽的抗血清能够阻断完整的 hTNF- α 分子与其受体的结合, 且从上述 3 种抗血清中纯化的 IgG 也能阻断 hTNF- α 介导的细胞毒和 LPL 抑制作用。若将 hTNF- α 的抗血清与 hTNF- α (1—15)多肽预先孵育, 这一抗血清仍能阻断 hTNF- α 与其受体的结合。因此似乎是 1—15 位残基以外的区域参与了 TNF 与其受体的识别, 同时也参与维持具有生物学活性的 hTNF- α 稳定结构。

如上所述, hLT 分子的 1—25 和 84—89 位氨基酸残基(相当于 hTNF- α 分子的 1—9 和 67—70 位氨基酸)可调节 hLT 与其受体的结合. 针对 hTNF- α 的化学修饰和定点诱变研究表明: 15, 31—35/32—34, 84—87/84—91, 117—119 及 143—148 位的氨基酸对 hTNF- α 的生物学活性至关重要. 此外, N 端缺失和抗体中和实验提示 11—31 位之间的某些氨基酸对 hTNF- α 的结构和受体结合活性也是至关重要的. 117—119 位氨基酸可能参与 hTNF- α 三聚体中亚基间的相互作用; 31—35, 84—87 及 143—148 位氨基酸位于环区, 且它们位于或靠近三聚体的表面. 将含 Ala84→Val 的突变型蛋白的晶体与其野生型进行对比分析, 结果显示了二者在形态上的一致. 由此可以肯定, Ala84→Val 导致 hTNF 生物学活性完全丧失的原因并非是因为 Val 其较长侧链引入后所形成的构象改变, 而是 Val 不能代替 Ala 与其受体的直接作用, 从而不能引起结合后的空间重排. 进一步的证据还表明, 与 Val84 邻近的 Ser86 与前者构成一个 β 转角环, 该环参与了受体结合位点的组成. 此外, 由于 Arg131 参与了 hTNF 中和抗体的结合部位, 而其本身不直接参与受体的相互作用, 因而 TNF 活性为其中和抗体所中和的原因很可能就是因为 Arg131 附近由 Ala 84-Ser 86-Val 91 所构成的 β -转角环被遮蔽所致, 而 Val91 则是通过其伸出分子表面的侧链来参与和 hTNF 受体的直接作用的. 上述其他几个氨基酸中, Leu 29→Ser, Arg 32→Thr 及 Leu 36→Phe 所引起的失活是由于突变引起邻近受体结合位点构象改变所致, Glu146 与受体的间接作用则是通过负电荷相互作用或构象改变来实现的^[16].

总之, 迄今为止的结果表明: hTNF 分子的几个位点的氨基酸残基, 尤其是 29, 32, 36, 84, 86, 91 及 146 位及其邻近位点的一些氨基酸, 它们参与了 hTNF- α 与其受体的结合并同时启动 hTNF- α 介导的生物学反应, 因此它们是 TNF 分子结构中最为重要的部分.

目前, 一般认为 TNF 的受体是与 TNF 分

子三聚体上的一个“V”形结构(Cleft)即受体结合位点相结合, 该位点的形成是在 TNF 三聚体形成时, TNF 单体分子相对两侧的两个亲水环区相互靠拢在相邻的两个单体间形成的; 这样的“V”性位点在 TNF- α 三聚体结构中有 3 个, 分别位于 3 个亚基之间, 并通过受体的群集来传递信号. 每个位点在 TNF- α 中由 Leu29, Arg32, Leu36, Ala84, Ser86, Val91 及 Glu146 位的氨基酸残基组成^[18], 在 TNF- β 分子中则包括 Asp50 及 Tyr108 的邻近区域^[17], 通过这两个不同的位点, TNF- α 与 β 能与相同的受体相结合.

表 2 hTNF 受体结合位点的氨基酸组成

氨基酸	在 TNF 分子上的位置
肿瘤坏死因子(hTNF- α)	
亮氨酸	29
精氨酸	32
亮氨酸	36
丙氨酸	84
丝氨酸	86
缬氨酸	91
谷氨酸	146
淋巴毒素(hTNF- β)	
天冬氨酸	50
酪氨酸	108

5 针对 hTNFs 的细胞表面受体

现有的资料表明^[19], hTNF 受体在除红细胞外所有类型体细胞上表达, 在不同类型的细胞上有两种不同的肿瘤坏死因子受体, 它们的分子量一种约为 55kD, 另一种约为 75kD, 分别命名为肿瘤坏死因子结合蛋白 I (tumor necrosis factor binding protein I, TBP I) 和 II (TBP II), 两者都能以高亲和力与 hTNF- α /hLT 特异性结合. 这两种受体的基因都已克隆, 根据其序列资料推导, I 型和 II 型 TBP 分别由 455 个和 461 个氨基酸组成, 它们都由信号肽、胞质结构域、跨膜结构域及胞外结构域 4 个结构域组成, 它们在氨基酸组成、结构域的长度及糖基化程度等几个方面都存在差异, 但令人信服的证据表明, hTNF- α /hLT 与这两种受

体的亲和力都是相近的,虽然有报道说 hTNF- α /hLT 对 75Kd 受体的亲和力不同,但这种差异在细胞应答中是否显著仍有待证实。

自从 hTNF/hLT 被发现以来,经过大量的研究,对它们的认识已逐渐成熟。尽管 hTNF- α 的临床试验已经取得了某些令人振奋的结果,但总体来说还是不尽人意,比如 hTNF- α 的毒副作用等。因此,人们对 hTNF 结构及其结构与功能关系进行研究,目的就是要在分子水平上阐明肿瘤坏死因子的作用机制,从而为在分子水平上改造 hTNF- α /hLT 提供理论依据。在今后较长的一段时间内,对于 hTNF 的研究将主要集中在以下 3 个方面:a. hTNF- α /hLT 的结构与功能关系的深入研究;b. hTNF 与其受体相互作用关系的研究;c. 在前两个方面的基础上,在基因水平和蛋白质水平上对 hTNF 加以改造。相信在不久的将来,人们一定能够获得一种或几种性能更为优良的肿瘤坏死因子并应用于临床。

参 考 文 献

- 1 Semenzato G. Tumor Necrosis Factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer*, 1990; **61**(3): 354
- 2 Gray P W, Aggarwal B B, Benton C V *et al.* Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin: a lymphokine with tumor necrosis activity. *Nature*, 1984; **312**:721
- 3 Aggarwal B B, Henzel W J, Moffat B *et al.* Primary structure of human lymphokine derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J Biol Chem*, 1985; **260**(4):2334
- 4 Lewit-Bentley A, Fourme R, Kahn R *et al.* Structure of tumor necrosis factor by X-ray solution scattering and preliminary studies by single crystal X-ray diffraction. *J Mol Biol*, 1988; **199**(2):389
- 5 Wingfield P, Pain R G, Craig S *et al.* Tumor necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Letters*, 1987; **211**(2): 179
- 6 Jones E Y, Stuart D I, Walker N P C *et al.* Structure of tumor necrosis factor. *Nature*, 1989; **338**:225
- 7 Eck M J, Sprang S R. The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. *J Biol Chem*, 1989; **264**(29):17595
- 8 Aggarwal B B. Differences in the biological responses and the structure of lymphotoxin and tumor necrosis factor. In: Bonavida B and Granger G eds, *Tumor necrosis factor: Structure, mechanism of action, role in disease and therapy*, Switzerland: Karger S, Basel, 1990:49
- 9 Seow H-F, Goh C R, Krishnan L *et al.* Bacterial expression, facile purification and properties of recombinant human lymphotoxin (TNF- β). *Bio-Technology*, 1989; **7**(4): 363
- 10 Creasey A A, Doyle L V, Reynolds M T *et al.* Biological effects of recombinant human tumor necrosis factor and its novel mutants on tumor and normal cell lines. *Cancer Res*, 1987; **47**(1):145
- 11 Kamijo R, Takeda K, Nagumo M *et al.* Induction of differentiation of human monoblastic and myeloblastic leukemia cell lines by TNF mutants. *Biochem & Biophys Res Commun*, 1989; **160**(2):820
- 12 Schollmeier K. Personal Communication.
- 13 Kobayashi Y, Miyamoto D, Asada M *et al.* Cloning and expression of human lymphotoxin mRNA derived from a human T cell hybridoma. *J Biochem*, 1986; **100**(3):727
- 14 Van Ostade X, Tavernier J, Fiers W *et al.* Two Conserved tryptophan residues of tumor necrosis factor and lymphotoxin are not involved in the biological activity. *FEBS Letters*, 1988; **238**(2):347
- 15 Yamagishi J, Kawashima H, Matsuo N *et al.* Mutational analysis of structure-activity relationships in human tumor necrosis factor- α . *Protein Engineering*, 1990; **3**:713
- 16 Van Ostade X, Tavernier J, Prange T *et al.* Localization of the active site of human tumor necrosis factor (hTNF) by mutational analysis. *EMBO J*, 1991; **10**(4):827
- 17 Wakabayashi T, Asada M, Nagasu T *et al.* Deletion of lysine 84 to lysine 89 enhances the cytotoxicity and the receptor binding affinity of human lymphotoxin. *J Biol Chem*, 1990; **265**(13):7604
- 18 Socher S H, Rimens M W, Martinez D *et al.* Antibodies against amino acids 1—15 of tumor necrosis factor block its binding to cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**:8829
- 19 Sprang S R. The divergent receptor for TNF/tumor necrosis factor- α , tumor necrosis factor- β , cytokines, molecular data, amino acids sequence, cellular regulation. *TIBS*, 1990; **15**(10):366