

ELŻBIETA WAŁAJTYS-RODE

*Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN  
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

## CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW

### CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW (TNF, TUMOR NECROSIS FACTOR)

#### WYKRYCIE I USTALENIE BUDOWY TNF- $\alpha$ I TNF- $\beta$

Na przełomie obecnego stulecia chirurg William Coley zaobserwował, że gdy u chorych na raka rozwijają się bakteryjne zakażenia, może dojść do martwicy nowotworu. W nadziei, że może to stanowić drogę leczenia, Coley zaczął wstrzykiwać chorym na raka nadsącz, uzyskiwany z hodowli bakteryjnych, zwany „toksyną Coleya”. Powodował w ten sposób krwotoczną martwicę nowotworów, ale równocześnie występowało wiele niekorzystnych objawów ubocznych, co sprawiło, że koncepcja ta upadła.

Wiele lat później zidentyfikowano aktywny składnik „toksyny Coleya” jako lipopolisacharyd (LPS) będący składnikiem ścian bakterii. Sam LPS nie powoduje martwicy nowotworów, ale indukuje produkcję przez makrofagi i inne komórki substancji, nazwanej przez CARSWELLA terminem „tumor necrosis factor” (TNF, czynnik martwicy nowotworów), która jest cytotoksyczna dla pewnych komórek nowotworowych (CARSWELL i współaut. 1975). Czynnik ten został następnie oznaczony literą  $\alpha$ , jako TNF- $\alpha$ . Również w latach osiemdziesiątych inne zespoły badaczy niezależnie wykryły, że czynnik wytwarzany przez zaktywowane makrofagi jest odpowiedzialny za występowanie stanu katabolicznego prowadzącego do utraty wagi ciała, wyniszczenia i śmierci w wyniku raka oraz pewnych zakażeń bakteryjnych i pasożytniczych. Czynnik ten nazwano kachektyną. Sklonowanie genów odpowiedzialnych za syntezę TNF- $\alpha$  i kachektyny pozwoliło ustalić, że to jest to samo białko (cyt. w VILCEK i LEE 1991).

Ludzki TNF- $\alpha$  został oczyszczony do homogenności z nadsączu hodowli linii HL-60 komórek białaczki promielocytarnej, stymulowanych estrem forbolowym (PMA) przez AGGARWALA i współpracowników (1985). Przeprowadzono również badania porównawcze z inną cytolityczną limfokiną, wydzielaną przez te komórki, a mianowicie limfotoksyną  $\alpha$ , którą nazwano TNF- $\beta$ . Po ustaleniu sekwencji aminokwasów TNF- $\alpha$ , zbudowanego ze 157 aminokwasów (17 kDa) i TNF- $\beta$ , w którego skład wchodzi 171 aminokwasów (25 kDa) stwierdzono, że sekwencje te są w około 50% homologiczne. Ten sam zespół uzyskał również cDNA klonu TNF- $\alpha$  i dokonał analizy jego sekwencji, która potwierdziła opisane wyniki (AGGARWAL i współaut. 1985). Główne różnice w budowie TNF- $\alpha$  i - $\beta$  polegają na

zawartości aminokwasów zawierających siarkę. TNF- $\alpha$  zawiera mostek dwusiarczkowy utworzony przez dwie reszty cysteinowe i nie zawiera metioniny, podczas gdy TNF- $\beta$  nie zawiera cysteiny, natomiast trzy metioniny. TNF- $\beta$  zawiera również przyłączoną do asparagianinu cząsteczkę węglowodanową, co sprawia, że różni się od TNF- $\alpha$  reaktywnością immunochemiczną. Stanowi to ważny element w różnicowaniu tych białek, wykazują one bowiem wiele podobieństw w aktywności biologicznej, na przykład oba powodują liżę mysiego włóknia komińskiego L-929 *in vitro* (komórki używane do oznaczania TNF metodą biologiczną) oraz martwicę mięsaka Meth A *in vivo*. Obie cytokiny różnią się również mechanizmem prowadzącym do ich uwalniania z komórek. TNF- $\beta$  jest wydzielany w procesie typowym dla sekrecji białek z komórki, podczas gdy TNF- $\alpha$  jest uwalniany z prekursora błonowego poprzez proteolizę prawdopodobnie w wyniku działania proteazy serynowej (VILCEK i LEE 1991). W wielu pracach brak jest rozróżnienia, o którą formę TNF chodzi. Lista komórek zdolnych do ekspresji i uwalniania TNF- $\alpha$  ciągle rośnie, prawdopodobnie nie jest ona również zamknięta w stosunku do TNF- $\beta$  (patrz tabela 1).

Tabela 1

Komórki wytwarzające białko lub mRNA TNF- $\alpha$  i/lub - $\beta$  po  
specyficznej stymulacji

Rodzaj komórki	TNF alfa	TNF beta
Monocyty i makrofagi	+	
Komórki T (CD4+ i CD8+)	+	+
Komórki B	+	+
Komórki LAK	+	+
Komórki NK	+	
Fibroblasty	+	
Neutrofile	+	
Eozynofile	+	
Komórki tuczne	+	
Astrocyty	+	+
Komórki śródbłonna	+	
Komórki mięśni gładkich	+	
Różne linie komórek nowotworowych	+	+

Należy zaznaczyć, że w wielu komórkach prekursorzy cząsteczki TNF- $\alpha$  są wbudowane w błonę komórkową. Cząsteczki TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  (czyli limfotoksyna), są formami uwalnianymi z komórek, w odróżnieniu od opisanej ostatnio limfotoksyny, która jest formą błonową, posiadającą zdolność wiązania formy  $\alpha$  i tworzenia funkcjonalnych heteromerów limfotoksyny  $\alpha$ - $\beta$  na powierzchni komórek (CROWE i współaut. 1994).

Do czynników indukujących produkcję TNF w komórkach oprócz endotoksyny bakteryjnej (LPS), pewnych wirusów (retrowirusów) i komórek nowotworowych należą również mitogeny, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów-makrofagów (GM-CSF), interleukiny 1 i 2, interferony, estry forbolowe

i jonofory wapniowe. Supresja produkcji TNF jest powodowana cyklosporyną A, transformującym czynnikiem wzrostu (TGF- $\beta$ ), prostaglandyną E<sub>2</sub>, glikokortykosteroidami, cyklicznymi nukleotydami, inhibitorami lipooksygenazy, interleukinami 4 i 6 oraz histaminą (AGGARWAL 1992) .

#### ROLA TNF- $\alpha$ I - $\beta$ W ORGANIZMIE

Badanie roli TNF rozpoczęło się od obserwacji przeciwnowotworowej aktywności tej cytokiny, uwalnianej przez zaktywowane endotoksynami bakteryjnymi makrofagi i limfocyty. Przez pewien czas uważano nawet, że nie oddziałuje ona z normalnymi komórkami. Dopiero sklonowanie genu TNF- $\alpha$  i uzyskanie jego białkowego produktu pozwoliło stwierdzić jego wpływ na różne typy komórek. Obecnie wiadomo, że TNF- $\alpha$  i - $\beta$  mają podobną, choć nieidentyczną aktywność biologiczną i należą do najbardziej wieloczynnościowych cytokin. Biorą one udział w regulacji normalnego rozwoju i homeostazy komórek. Pośredniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej, warunkującej odporność organizmu na wiele czynników zakaźnych oraz biorą udział w eliminacji złośliwych nowotworów. Uczestniczą w rozwoju reakcji zapalnej, która rozwija się w celu eliminacji różnych inwazyjnych patogenów, a przy nadmiernej stymulacji prowadzą do rozwoju wielu procesów patologicznych.

Szeroko zakrojone badania kliniczne wykazały, że obie te cytokiny stanowią istotną składową wstrząsu septycznego rozwijającego się w wyniku zakażenia bakteriami Gram-negatywnymi, zespołu ostrej niewydolności oddechowej dorosłych (ARDS), reumatoidalnego zapalenia stawów, pewnych zaburzeń autoimmunologicznych oraz choroby wywołanej reakcją przeszczepu przeciwko gospodarzowi (VILCEK i LEE 1991.)

Wspomniane patogenne właściwości TNF polegają na jego zdolności do aktywacji wielu reakcji komórek leukocytarnych oraz zwiększaniu przyczepności komórek śródbłonka naczyń, co powoduje stymulację aktywności prokoagulacyjnej płytek krwi w wielu narządach. TNF- $\alpha$  i - $\beta$  działają jako modulatory funkcji neutrofilów poprzez zwiększenie produkcji i uwalnianie aktywnych metabolitów tlenowych. TNF- $\alpha$  powoduje nagromadzenie i aktywację innych komórek zapalnych, jak eozynofile oraz aktywację limfocytów i komórek śródbłonka naczyń (LEPPER-WOODFORD i współaut. 1991, PARSONS i współaut. 1992). Reakcja może ulec spotęgowaniu poprzez oddziaływanie TNF- $\alpha$  na inne typy komórek, które uwalniają czynniki zapalne, takie jak IL-1 i metabolity kwasu arachidonowego, a także czynnik aktywujący płytki (PAF) (TRACEY i współaut. 1988).

Postuluje się istotną rolę TNF w chorobach płuc, wynikających z reakcji nadwrażliwości, takich jak astma atopowa oraz ziarniniakowych, do których należą sarkoidoza i gruźlica płuc. Obecnie wiadomo, że choroby te mają podłoże immunologiczne i towarzyszy im aktywacja specyficznych podtypów limfocytów T oraz złożona interakcja pomiędzy tymi komórkami i makrofagami, komórkami polimorfonuklearnymi, jak neutrofile i eozynofile oraz komórkami tucznyymi i komórkami nabłonka dróg oddechowych. Zwiększenie nasilenia reakcji jest powodowane faktem, że TNF- $\alpha$  może być wydzielany również przez neutrofile i eozynofile, a także przez komórki tuczne pod wpływem wielu czynników stymulujących. TNF- $\alpha$  może bezpośrednio powodować degranulację komórek

tucznych i uwalnianie histaminy i tryptazy, enzymu proteolicznego znajdującego się w płucnych komórkach tucznych u ludzi (CEMBRZYŃSKA-NOWAK i współaut. 1993).

Występowanie opóźnionej fazy reakcji astmatycznej (po 6 i więcej godzinach od kontaktu z antygenem), jak i wytwarzanie ziarniniaków w sarkoidozie, czy rozwój procesu martwiczego w przebiegu gruźlicy płuc, są wynikiem interakcji zaktywowanych komórek i cytokin przez nie wytwarzanych. Zarówno w astmie atopowej, jak i w sarkoidozie istotne jest współdziałanie interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), który stymuluje prozapalne działanie TNF, polegające na aktywacji komórek nabłonka dróg oddechowych i zwiększaniu migracji komórek zapalnych, a także na zwiększaniu ekspresji receptorów dla TNF (STEFFEN i współaut. 1993, CEMBRZYŃSKA-NOWAK i współaut. 1993)

Stosując specyficzne aktywatory i inhibitory kinazy białkowej C (PKC) SER-FILIPPI i współpracownicy (1994) stwierdzili, że TNF- $\alpha$  odgrywa rolę w rozwoju skurczu naczyń i obrzęku płuc poprzez aktywację kinazy białkowej C, wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych i obniżenie poziomu tlenu azotu, znanego czynnika rozkurczowego mięśni gładkich dróg oddechowych.

Oprócz bakteryjnych endotoksyn, również wirusy powodują produkcję TNF- $\alpha$  przez płucne makrofagi lub monocyty z krwi obwodowej. W modelach *in vitro* TNF- $\alpha$  aktywuje, w sposób autokrywny, ekspresję wirusa HIV poprzez indukcję jądrowego czynnika transkrypcji NF-kB. Zwiększona produkcja TNF- $\alpha$  przez płucne makrofagi chorych zainfekowanych wirusem HIV, ze współistniejącymi oportunistycznymi zakażeniami mykobakteryjnymi (*Mycobacterium tuberculosis*) lub grzybiczymi (*Pneumocystis carinii*), może powodować rozszerzenie się infekcji w organizmie (ISRAEL-BIET i współaut. 1991). U chorych na AIDS TNF- $\alpha$  jest również odpowiedzialny za cytopenię we krwi obwodowej, wynikającą z jego supresyjnego działania na wzrost kolonii komórek progenitorowych szpiku kostnego, a także za wyniszczenie obserwowane w przebiegu tego zespołu. Kacheksja, czyli wyniszczenie, jest spowodowane hamowaniem przez TNF- $\alpha$  ekspresji genów odpowiedzialnych za enzymy szlaku syntezy lipidów w adipocytach oraz za syntezę lipazy lipoproteinowej i dehydrogenazy glicerofosforanowej (TRACEY i współaut. 1989).

W normalnych komórkach, takich jak ludzkie fibroblasty płucne, osteoblasty, astrocyty, a także komórki B, TNF stymuluje proliferację (AGGARWAL 1992, SELMAY i współaut. 1990, BOUSSIOTIS i współaut. 1994). Sprawia to, że TNF bierze udział w regulacji resorpcji kości oraz stanowi pośrednik pomiędzy układem immunologicznym i nerwowym. BOUSSIOTIS i współautorzy (1994) wykazali, że TNF- $\alpha$  jest autokrywnym czynnikiem wzrostu dla komórek B. Aktywacja ekspresji tego czynnika w ludzkich komórkach B zaktywowanych antygenem sugeruje, że TNF- $\alpha$  może być odpowiedzialny za proliferację komórek obserwowaną w kilku chronicznych chorobach zakaźnych, jak infekcja HIV, malaria i śpiączka afrykańska (trypanosomatoza).

MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁNIA TNF- $\alpha$  I - $\beta$ Charakterystyka receptorów dla TNF- $\alpha$  i - $\beta$ 

TNF wywołuje biologiczne efekty przez interakcję ze specyficznymi receptorami o wysokim powinowactwie, zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej komórek. Scharakteryzowano, po uprzednim sklonowaniu i ekspresji cDNA, dwa ludzkie receptory dla TNF, 55 kDa, nazwany p55 TNF-R i 75 kDa, nazwany p75 TNF-R, oba wiążące zarówno TNF- $\alpha$  jak i - $\beta$  (limfotoksynę  $\alpha$ ). Liczba miejsc wiążących wynosi od 100 do 10000 na komórkę. Oba receptory TNF składają się z domeny zewnątrzkomórkowej, w której są zlokalizowane miejsca wiążące TNF, części wewnątrzblonowej oraz wewnątrzkomórkowej. Odcinki o homologicznej sekwencji aminokwasów (28%) występują w części znajdującej się na zewnątrz komórki, nie obserwuje się ich natomiast w części wewnątrzkomórkowej, co sugeruje, że odcinki zlokalizowane wewnątrzkomórkowo są częścią różnych dróg przenoszenia sygnału. P75 TNF-R (typ A) występuje głównie na komórkach pochodzących ze szpiku, podczas gdy p55 TNF-R (typ B) są obecne na komórkach typu nabłonkowego. Po przyłączeniu TNF do obu typów receptorów kompleks ulega szybkiej internalizacji i degradacji. Receptory te nie ulegają recykliczacji i utrzymanie stałej ilości receptorów na powierzchni komórki wymaga syntezy białka (BEYAERT i FIERS 1994). Badania krystalograficzne pokazały, że zarówno TNF- $\alpha$ , jak i - $\beta$  występują jako homotrimery, które są aktywnymi formami tych cytokin. Przenoszenie sygnału jest inicjowane przez krzyżowe połączenie dwu lub więcej receptorów na powierzchni komórki przez homotrimery TNF.

Istotną rolę receptorów dla TNF wykazano badając transgeniczne myszy pozbawione p55 TNF-R. U zwierząt tych stwierdzono upośledzenie w usuwaniu patogennych bakterii, prowadzące do śmierci w wyniku infekcji, a także dużą odporność na wstrząs septyczny powodowany lipopolisacharydem (endotoksyną, LPS). Jednakże populacja limfocytów i rozwój tymocytów u tych myszy nie odbiegały od normy. Wiele badań potwierdziło, że p55 TNF-R odgrywa rolę w cytotoksyczności i procesie apoptozy, stymulowanej przez TNF w wielu liniach komórkowych, a także pośredniczy w innych skutkach działania TNF, takich jak indukcja ekspresji i wydzielania cytokin, proliferacja fibroblastów oraz synteza prostaglandyn. Funkcja p75 TNF-R nie jest ostatecznie zdefiniowana, ale uważa się, że może on pełnić rolę w procesie cytotoksyczności oraz w stymulowaniu proliferacji fibroblastów. Dotychczas ustalono rolę p75 TNF-R w limfocytach T i pochodnych liniach komórkowych, gdzie TNF moduluje wydzielanie cytokin i proliferację komórek (SMITH i współaut. 1994). Ekspresja receptorów dla TNF jest stymulowana w sposób autokryny przez TNF oraz przez interferony, dibutyrylo cAMP (analog cAMP), maślan oraz lektyny i hamowana przez interleukinę -1 (IL-1), czynnik stymulujący wzrost makrofagów i granulocytów (GM-CSF), estry forbolowe, glikokortykosteroidy, czynniki depolimeryzujące mikrotubule i przez polisacharydy (HIGUCHI i AGGRAWAL 1993).

Ostatnie badania wykazują, że zewnątrzkomórkowa domena receptorów TNF wykazuje strukturalne podobieństwo z pewnymi innymi receptorami i częściami powierzchniowymi komórek, które tworzą wspólną rodzinę receptorów i ligan-

dów (SMITH i współaut. 1994). Należą do nich, oprócz receptorów dla TNF, także receptor czynnika wzrostu nerwów o niskim powinowactwie, cząstki powierzchniowe CD40, CD30, CD27 i OX40 komórek T i B oraz antygen Fas. Odkryto również limfotoksynę  $\beta$ , wiążącą kompleks tworzony przez limfotoksynę  $\alpha$  i  $\beta$  na powierzchni komórek, takich jak cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK, co sugeruje rolę tych cząstek w odpowiedzi immunologicznej (CROWE i współaut. 1994). Występują również rozpuszczalne formy receptorów TNF, kodowane i wydzielane pod wpływem zakażenia wirusem ospy, których rola polega na wiązaniu i inaktywacji wydzielanego TNF (SMITH i współaut. 1994). Zróżnicowanie odpowiedzi komórek limfoidalnych, krwiotwórczych i innych linii na aktywację tej grupy receptorów tworzy sieć oddziaływań w procesach rozwoju i regulacji.

Grupa ligandów dla receptorów TNF oraz Fas i CD30 charakteryzuje się możliwością indukcji śmierci komórki poprzez martwicę lub proces apoptozy. Antygen Fas i 55p TNF-R posiadają homologiczny region w ich części cytoplazmatycznej, który jest istotny dla indukcji programowanej śmierci (apoptozy) komórek. Należy podkreślić, że zarówno receptor Fas, jak i receptory dla TNF- $\alpha$  i - $\beta$  wykazują działanie plejotropowe, sprawiając, że komórki B, fibroblasty, jak i pewne komórki nowotworowe mogą odpowiadać proliferacją na sygnał. Specyficzna odpowiedź, prowadząca do śmierci komórki lub do jej podziału, zależy od typu komórki, stopnia jej zróżnicowania, stanu transformacji i obecności innych czynników stymulujących. Ze względu na znaczący udział w regulacji układu immunologicznego oraz powodowanie apoptozy, omawiana rodzina receptorów jest bardzo istotna dla rozwoju i homeostazy kręgowców (BEUTLER i VAN HUFFEL 1994).

Mechanizmy przenoszenia sygnału TNF- $\alpha$  i - $\beta$  w komórce i ich rola w procesie hamowania rozwoju komórek nowotworowych

Zainteresowanie TNF rozpoczęło się od stwierdzenia jego istotnej roli w zabijaniu komórek nowotworowych *in vitro* przez zaktywowne makrofagi i cytotoksyczne komórki T. Dotychczas największą ilość badań poświęcono niewątpliwie próbom wyjaśnienia tego zjawiska. Wiadomo od dawna, że różne komórki nowotworowe wykazują bardzo zróżnicowaną wrażliwość na działanie TNF, która nie zależy od typu lub histologicznego pochodzenia komórek. Można przyjąć jako regułę, że nie stransformowane linie komórkowe są niewrażliwe na cytotoksyczne działanie TNF jakkolwiek embrionalne fibroblasty są wyjątkiem. Znane są też linie komórek nowotworowych nie reagujących na TNF (SUGARMAN i współaut. 1985). Wiele linii komórek nowotworowych, opornych na TNF uzyskuje wrażliwość na ten czynnik, jeśli jest on podany wspólnie z INF- $\gamma$  lub pewnymi lekami stosowanymi w chemioterapii. Pomimo intensywnych badań molekularny mechanizm cytotoksyczności TNF i oporności w stosunku do tej cytokiny nie jest jeszcze wyjaśniony, ale postuluje się udział w nim wielu czynników (BEYAERT i FIERS 1994).

Gen kodujący TNF- $\alpha$  należy do grupy genów podlegających najwcześniejszej transkrypcji; która następuje już po 30 min od aktywacji komórek T i B antygenem i nie wymaga syntezy białka. Wiadomo również, że cytotoksyczność TNF nie wymaga syntezy RNA lub białka. Co więcej, cytotoksyczna aktywność TNF wzrasta w obecności inhibitorów transkrypcji (aktynomycyna D) lub trans-

lacji (cykloheksimid). Inhibitory te uwrażliwiają na TNF pewne linie komórek nowotworowych, opornych w stosunku do tej cytokiny. Sugeruje to obecność lub indukcję przez TNF w komórce białka powodującego oporność na tę cząsteczkę. Warto też wspomnieć, że transfekcja wrażliwych na TNF komórek włókniakomiesaka myszy L 929 genem *TNF* powoduje wystąpienie oporności (HIME-NO i współaut. 1990).

Zróznicowane oddziaływanie  $TNF-\alpha$  i  $-\beta$  na procesy komórkowe wynika z heterogenności receptorów dla tych cytokin oraz, w znacznie większym stopniu, z wielości dróg postreceptorowego przenoszenia sygnału. Liczne badania wykazały aktywację wielu wtórnych pośredników przenoszenia sygnału spośród poznanych dotychczas w komórkach ssaków oraz w wielu innych procesach komórkowych. Można je podzielić na kilka grup omówionych poniżej.

Stymulacja wiązania GTP i aktywności GTP-azy w błonie komórkowej

Zbadano, że toksyna ksztuśca (*petrussis toxin*), która rozsprzęga białka Gt, Gi i Go od receptora, hamuje cytotoksyczność TNF oraz cofa wpływ TNF na zwiększone wiązanie nukleotydów guaninowych do błony komórek L929 i HL-60 i stymulację aktywności GTP-azy w tych komórkach (IMAMURA i współaut. 1988), co może świadczyć o udziale tych białek w cytotoksyczności TNF.

Aktywacja fosfolipaz

Istotna jest zwłaszcza aktywacja fosfolipazy A2, cytozolowego enzymu o wysokiej masie cząsteczkowej, specyficznego dla kwasu arachidonowego. Aktywność tego enzymu jest indukowana przez TNF w komórkach HeLa, a wprowadzenie genu tego enzymu przywraca wrażliwość odpornej na TNF linii komórek L929. Stwierdzono również aktywację fosfolipazy C, zwłaszcza specyficznej dla fosfatydylocholiny, prowadzącą do nagromadzenia dwuacyloglicerolu i w konsekwencji do aktywacji kinazy białkowej C. Proces ten jest stymulowany przez aktywację fosfolipazy C katalizującej powstawanie fosfoinozytoli z błonowego dwufosforanu fosfatydyloinozytoli, spośród których trójfosfoinozytol stymuluje usuwanie jonów wapnia do cytozolu komórki i w ten sposób powoduje dalszą aktywację kinazy białkowej C. Aktywacja fosfolipazy D opisana w komórkach L929 prowadzi do nagromadzenia kwasu fosfatydowego. Powoduje to również wzmożone uwalnianie jonów wapnia i wzrost stężenia jego wolnych jonów w cytozolu komórki. Należy zaznaczyć, że brak jest jednak dotychczas dowodów na bezpośredni udział różnych fosfolipaz i ich produktów w cytotoksyczności TNF (BEYAERT i FIERS 1994).

Aktywacja neutralnej sfingomielinazy komórkowej

Enzym ten, zlokalizowany w błonie komórkowej, hydrolizuje sfingomielinę z utworzeniem ceramidu. Stwierdzono, że interakcja  $TNF-\alpha$  z receptorem 55 TNF-R powoduje aktywację sfingomielinazy i nagromadzenie ceramidu w komórce, co powoduje różnicowanie komórek HL-60 ludzkiej białaczki promielocytowej w kierunku monocytów (KIM i współaut. 1991), a także wywołuje apoptozę tych komórek, jak również komórek U937 białaczki monoblastycznej i włókniakomiesaka myszy L 929 i WEHI (JARVIS i współaut. 1994).

Wykazanie indukcji apoptozy w liniach komórkowych, w tym pochodzących ze szpiku, pozwala sądzić, że sygnał TNF poprzez ceramid selektywnie wywołuje

apoptozę oraz że enzymy aktywowane przez ceramid są istotnymi komponentami tej kaskady przenoszenia sygnału. Do enzymów aktywowanych przez ceramid należą zlokalizowana w błonie serynowo/treoninowa kinaza białkowa (MATHIAS i współaut. 1991) oraz cytozolowa fosfataza białkowa (DOBROWSKY i HANNUN 1992). Rola tych enzymów zostanie omówiona w punkcie dotyczącym fosforylacji białek.

#### Fosforylacja białek komórkowych

W ciągu paru minut od zadziałania TNF obserwuje się fosforylację wielu różnych białek w komórkach w wyniku aktywacji kilku białkowych kinaz. W niewielu liniach komórkowych obserwowano aktywację kinazy białkowej C, a także wzrost stężenia cyklicznego AMP i aktywację kinazy białkowej A (VILCEK i LEE 1991), jakkolwiek nie są one prawdopodobnie niezbędne do działania TNF, ponieważ stosowanie inhibitorów tych kinaz nie eliminuje cytotoksycznej aktywności TNF.

Stwierdzono również aktywację kilku cytozolowych serynowo/treoninowych kinaz białkowych, do których należą kinaza-2 kazeinowa oraz aktywowane mitogenami kinazy białkowe MAP.

Wiadomo, że grupa tyrozynowych kinaz białkowych wykazuje wysoki stopień homologii z produktem protoonkogenu *c-src*, a aktywność tyrozynowej kinazy białkowej pp60c-*src* wzrasta przejściowo podczas mitozy i ulega obniżeniu w okresie interfazy komórkowej (ZHENG i współaut. 1992). Pewne linie komórkowe ludzkich nowotworów, do których należą A-549 (gruczolakorak płuc), HT29 (rak odbytu) i SK-OV-3 (rak jajników), które mają zwiększoną ekspresję *c-src*, są odporne na TNF- $\alpha$ . Badania grupy Aggrawala wykazują rolę onkogenów, kodujących białka o aktywności tyrozynowych kinaz białkowych, w indukcji oporności komórek dla antyproliferacyjnego działania TNF- $\alpha$ . W 1988 roku stwierdzono, że oporność na rekombinantowy TNF- $\alpha$  (rTNF- $\alpha$ ) pojawia się w komórkach ludzkiego raka sutka, wykazujących zwiększoną ekspresję receptora 2 dla ludzkiego nabłonkowego czynnika wzrostu HER2/ERBB2, który jest tyrozynową kinazą białkową. Zwiększenie ekspresji onkogenu *HER2* powoduje oporność na hamowanie wzrostu komórek NIH3T3 przez rTNF- $\alpha$  i zaktywowane makrofagi *in vitro* oraz transformację komórek i rozwój nowotworów. Pojawieniu się oporności towarzyszy wzrost stałej dysocjacji wiązania rTNF- $\alpha$  do jego receptorów (HUDZIAK i współaut. 1988). AGGRAWAL i współautorzy (1994) wykazali, że zwiększona ekspresja tyrozynowej kinazy białkowej pp60v-*src*, będącej produktem onkogenu wirusa mięsaka Rousa powoduje wystąpienie oporności na TNF- $\alpha$  w komórkach fibroblastów mysich NIH3T3 poddanych transfekcji genem *pp60v-src*. Wystąpienie oporności było skorelowane z obniżeniem wewnątrzkomórkowego poziomu zredukowanego glutationu. Należy zaznaczyć, że zwiększenie ekspresji onkogenu *HER2* towarzyszy wielu liniom inwazyjnego ludzkiego raka sutka, zaś wzrost ekspresji tyrozynowej kinazy białkowej pp60v-*src* stwierdzono w neuroblastomie, rakach odbytu, pęcherza, sutka i drobnokomórkowym raku płuc.

Badania ZHENG i współpracowników (1992) rozszerzyły zasób wiadomości na temat mechanizmu transformacji komórek przez rodzinę tyrozynowych kinaz białkowych *src* stwierdzając, że biorą w nim udział tyrozynowe fosfatazy białko-



we. Autorzy ci wykazali, że zwiększenie ekspresji tyrozynowej fosfatazy białkowej w opornych na TNF- $\alpha$  komórkach G418, wywodzących się z fibroblastów embrionów szczurów rasy Fischer, prowadzi do trwałej aktywacji kinazy tyrozynowej pp60c-src i następnie do transformacji i rozwoju nowotworów. Nie stwierdzono natomiast zwiększenia ilości białka pp60c-src w tych komórkach. Sugeruje to udział tyrozynowych fosfataz białkowych w regulacji procesu proliferacji komórek i oporności na antyproliferacyjne działanie TNF- $\alpha$ . Rolę tyrozynowych kinaz i fosfataz białkowych w mechanizmie cytotoksyczności TNF potwierdzają również badania z użyciem specyficznych inhibitorów tych enzymów. Występuje znaczny efekt synergistyczny pomiędzy działaniem TNF- $\alpha$  i saturosporyny, inhibitora tyrozynowych kinaz białkowych. Natomiast jony wanadowe — inhibitor tyrozynowych fosfataz białkowych — hamują cytotoksyczność tej cytokiny (BEYAERT i FIERS 1994).

Badając mechanizm apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki powodowanej przez TNF w kilku nowotworowych liniach komórkowych, WRIGHT i współautorzy (1993) wysunęli hipotezę, że fosforylacja białek może determinować wrażliwość lub oporność na powodowanie apoptozy przez ten czynnik. W odróżnieniu od martwicy, która jest wynikiem patologicznego uszkodzenia komórki i która poprzez obrzęk organelli, uszkodzenie błony i rozpad DNA prowadzi do śmierci komórki, apoptoza jest fizjologicznym mechanizmem śmierci komórki, realizowanym w wyniku odmiennych mechanizmów, jakkolwiek pod wpływem tych samych czynników stymulujących. TNF powoduje apoptozę między innymi linii chłoniaka histiocytarnego U937, raka sutka BT-20 i raka prostaty LNCap. Autorzy ci wykazali, że inhibitory serynowo-treoninowych fosfataz białkowych PP1 i PP2A, kwas okadajowy i kalikulina, w sposób synergistyczny stymulują zależną od TNF apoptozę komórek U937. Oba te inhibitory znoszą oporność na TNF komórek U9-TR wyprowadzonych z U937. Ponieważ nie stwierdzono bezpośredniego hamowania przez TNF fosfataz białkowych, postuluje się, że cytokina ta działa przez stymulację kinazy lub kinaz białkowych. Do potencjalnych kandydatów należą kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kinaza-2 kazeinowa i kinazy aktywowane przez mitogeny (MAPK) (VIETOR i współaut. 1993).

Aktywacja i indukcja czynników transkrypcji oraz ekspresji genów i białek

Pleiotropowe działanie biologiczne TNF wynika głównie ze zdolności tej cytokiny do aktywacji zdumiewająco dużej liczby genów w komórkach docelowych. Tę aktywność porównać można tylko do aktywności interleukiny-1, innej wieloczynnościowej cytokiny o podobnym spektrum aktywności biologicznej.

Do najlepiej zbadanych czynników transkrypcji, aktywowanych przez TNF- $\alpha$ , należy NF-kappa B, którego aktywacja nie wymaga syntezy białka, co stanowi mechanizm szybkiej i bezpośredniej aktywacji transkrypcji. Do syntetyzowanych *de novo* pod wpływem TNF- $\alpha$  należą czynnik transkrypcji AP-1, będący produktem genów *c-fos* i *c-jun*, które również są indukowane przez TNF, a także dwa czynniki regulujące ekspresję interferonu, IRF-1 i IRF-2. Do długiej listy genów, których ekspresja jest stymulowana przez TNF, należą interleukiny-1 alfa i beta, interleukina-6, interleukina-8, interferon-beta, płytkowy czynnik wzrostu, czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów, receptory dla interleukiny-2

i endotelialnego czynnika wzrostu, cząstki przyczepności międzykomórkowej ELAM-1 i ICAM-1, a także kompleksy czynnika zgodności tkankowej MHC klasy I i II. TNF- $\alpha$  wpływa na ekspresję genu *c-myc*, odgrywającego ważną rolę w procesie indukcji wzrostu komórek oraz ich różnicowania, a także w toksyczności tej cytokiny dla komórek nowotworowych (VILCEK i LEE 1991, NINOMIYA-TSUI i współaut. 1993, JANICKE i współaut. 1994).

Stymulacja tworzenia aktywnych metabolitów tlenowych w mitochondriach

Wiele komórek po inkubacji z TNF wykazuje zmiany w morfologii mitochondriów, a także zaburzenia procesu przenoszenia elektronów w łańcuchu oddechowym. Takie komórki wykazują oporność na cytotoksyczne działanie TNF. Z drugiej strony wykazano, że TNF- $\alpha$  i - $\beta$  indukują mRNA zależnej od manganu dysmutazy ponadtlenkowej w mitochondriach wielu linii komórkowych normalnych i nowotworowych ludzkich i zwierzęcych. Sugeruje się, że indukcja tego enzymu jest częścią mechanizmu obronnego przeciw cytotoksycznej aktywności TNF (WONG i GOEDEL 1988). Rolę wolnych rodników tlenowych w cytotoksyczności TNF potwierdza także ochronne działanie związków wiążących jony żelaza, które stymulują produkcję tych rodników w komórkach. Stwierdzono również bezpośrednio produkcję jonu ponadtlenkowego pod wpływem TNF (BEYAERT i FIERS 1994).

Spośród innych procesów komórkowych w mechanizmie cytotoksyczności TNF mogą brać udział proteazy serynowe oraz ADP-rybozylacja specyficznych białek (BEYAERT i FIERS 1994).

Rola TNF jako endogennego promotora powstawania nowotworów

W 1992 roku GUY i współpracownicy zaobserwowali, że kwas okadajowy, specyficzny inhibitor fosfataz białkowych typu P-2A i w mniejszym stopniu typu P-1, powoduje szybką fosforylację białek komórkowych w sposób porównywalny z obrazem uzyskiwanym po działaniu rTNF na ludzkie diploidalne fibroblasty FS-4. Obserwowane zmiany były identyczne zarówno w odniesieniu do fosforylacji białek cytozolowych i jądrowych, jak i do indukcji ekspresji genów. Kwas okadajowy jest również silnym promotorem nowotworów *in vivo* i *in vitro*. Inni badacze wykazali działanie TNF- $\alpha$  jako promotora transformacji nowotworowej w komórkach mysich BALB/3T3, inicjowanych 3-metylocholanrenem, a także transfekowanych onkogenem *v-Ha-ras* (klon Bhas 42). W procesie transformacji TNF- $\alpha$  działał około 1000 razy bardziej efektywnie niż chemiczne promotory nowotworów, kwas okadajowy i estry forbolowe. Należy zaznaczyć, że TNF- $\alpha$  indukuje wzrost linii Bhas 42, podczas gdy nie stymuluje wzrostu nietransfekowanej linii komórek BALB/3T3. Wyniki te wykazują, że ludzki TNF- $\alpha$  powoduje klonowy wzrost inicjowanych komórek. Pozwoliło to autorom wysunąć hipotezę o działaniu TNF jako endogennego promotora nowotworów oraz generalnego pośrednika w procesie promowania nowotworów (FUJIKI i SUGANUMA 1994).

ZATOSOWANIE TNF W LECZENIU PEWNYCH TYPÓW NOWOTWORÓW

Sklonowanie genów kodujących TNF- $\alpha$  i - $\beta$  umożliwiło produkcję znacznych ilości tych cytokin techniką rekombinacji DNA i podjęcie prób stosowania ich w klinice u chorych z nowotworami. Niestety, wyniki są dalekie od spełnienia nadziei wykrycia cudownego leku przeciwnowotworowego. Po przeprowadzeniu

wielu badań okazało się, że u pewnych chorych po iniekcji rTNF- $\alpha$  bezpośrednio do guza występowała regresja, u innych zaś tylko zatrzymanie rozwoju nowotworu, a często wręcz nie obserwowano żadnej zmiany (WATANABE i współaut. 1994). Podawanie rTNF jest ograniczone jego krótkim czasem półtrwania w organizmie (< 60 min w osoczu krwi), trudnym do przewidzenia efektem i, w największym stopniu, niepożądanymi efektami ubocznymi, do których należą gorączka, dreszcze, obniżenie ciśnienia krwi, senność, letarg, nudności, zaburzenia neurologiczne, zapalenie żył i spadek ilości leukocytów we krwi obwodowej. Wysiłki badaczy zostały skierowane na opracowanie metodyki podawania TNF, zapobiegającej tym niekorzystnym zjawiskom. Stwierdzono, na przykład, synergistyczny wpływ podawanego wspólnie z TNF interferonu i tamoksyfenu, antagonisty estrogenu, w leczeniu raka sutka (MATSUO i współaut. 1992). Wyjaśniono również dobroczynny wpływ podawania BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), polegający na stymulacji makrofagów do wytwarzania TNF w leczeniu raka pęcherza (CONTI i współaut. 1994).

W 1991 roku STEVEN ROSENBERG i współpracownicy z National Cancer Institute w USA opracowali metodę uodporniania chorych na raka z użyciem komórek nowotworowych zmienionych metodami inżynierii genetycznej. Wprowadzano gen *TNF* do komórek czerniaka, uzyskanych od chorego w zaawansowanym stadium choroby, po czym wstrzykiwano te komórki ponownie. Kilka tygodni później pobierano choremu limfocyty z węzłów chłonnych i, po ich klonowym rozmnożeniu w hodowli, podawano pacjentowi (TOPALIAN i współaut. 1989). Ten sam zespół opracował również metodę immunoterapii raka z zastosowaniem infiltrujących guz limfocytów T, zmodyfikowanych genetycznie przez wprowadzenie genu *TNF*, które po wprowadzeniu do organizmu chorego powodują zwiększenie lokalnego stężenia TNF (HIRU i ROSENBERG 1994). W tym celu wykonano transfer genu *TNF*, włączonego do wektora pochodzącego od retrowirusa (na przykład wirus mięsaka Rousa). Metodę tą zastosowano do leczenia przerzutów płucnych u myszy z wykorzystaniem limfocytów infiltrujących guz, uzyskiwanych ze słabo immunizującego nowotworu mięsaka mysiego, indukowanego metylocholanem (MCA 102 hTNF), które po wprowadzeniu genu wydzielają ludzki TNF- $\alpha$  (MORINCOLA i współaut. 1994).

Sukces w leczeniu z zastosowaniem rTNF może również zależeć od ekspresji receptorów na komórkach nowotworowych, dlatego ISOBE i współpracownicy (1994) zaproponowali technikę polegającą na wprowadzeniu receptorów TNF-55 i TNF-75 do retrowiralnego wektora pLRNL i bezpośredniej jego iniekcji do komórek linii TK ludzkiego raka odbytu, charakteryzujących się bardzo małą ekspresją obu form receptorów dla TNF. Klony linii TK, zainfekowane retrowirusem zawierającym jedną lub obie formy receptora, wykazywały wysoką ekspresję tych cząsteczek i były zabijane po podaniu rTNF. Badania te są jeszcze w stadium doświadczeń na zwierzętach, ale ich wyniki budzą nadzieję z punktu widzenia poszukiwania nowych dróg w leczeniu nowotworów.

#### TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

The tumor necrosis factor family includes TNF- $\alpha$  (or cachectin), TNF- $\beta$  (or lymphotoxin  $\alpha$ ), and lymphotoxin  $\beta$ . A close relationship between TNF- $\alpha$  and - $\beta$  was established, when, after cloning of

the cDNA for these human cytokines in 1984, it appeared that they are in about 30% homologous. TNF- $\alpha$  is widely expressed in monocytes, macrophages, lymphocytes, natural killer cells, endothelial cells, mast cells, neutrophils and eosinophils, glial cells and astrocytes, smooth muscle cells and certain tumor cells. TNF- $\beta$  can be produced mainly by lymphocytes, astrocytes, lymphokine-activated killer cells and myeloma cells.

TNF- $\alpha$  and - $\beta$  bind to the same cell surface receptors and are functionally similar, although not identical. Originally described as antitumor agents (especially TNF- $\alpha$ ), these extraordinarily pleiotropic cytokines are considered today the primary mediators of immune regulation and inflammatory response. They play a beneficial role as immunostimulants and important mediators of host resistance to many infectious agents (bacteria, viruses, parasites) and malignant tumors. Overproduction of TNF- $\alpha$  and - $\beta$  is closely linked to development of many diseases, including septic shock, Adult Respiratory Distress Syndrome, rheumatoid arthritis, some autoimmune disorders, graft-host disease and cachexia.

TNF- $\alpha$  and - $\beta$  exert their biological effects by interaction with high-affinity cell surface receptors, which have been cloned and characterized as p55 TNF-R and p75 TNF-R, both binding either of the two TNF forms. The extracellular portions of the receptors form a receptor family characterized by four domains with regularly spaced cysteine residues. The lack of relatedness of the intracellular portions of the two receptors suggests that they activate different intracellular signaling pathways.

The multiplicity of actions of TNF- $\alpha$  and - $\beta$  can be ascribed to the facts that TNF receptors are present on virtually all the cells examined so far, and that TNF action leads to activation of multiple signal transduction pathways, kinases and transcription factors, as well as of an unusually large array of cellular genes.

Post-receptor mechanisms involved in TNF-induced cytotoxicity include such cell membrane events as G protein activation and neutral sphingomyelinase activation, the latter generating ceramide, which functions as intracellular mediator of apoptosis. Amplified expressions of the HER2/ERBB2 oncogene, a receptor tyrosine kinase, as well as of another oncogenic tyrosine kinase, pp60 v-src, induce resistance to TNF- $\alpha$  in NIH 3T3 cells. The role of protein phosphorylation in TNF-induced apoptosis was confirmed by results showing that in U937 cells the resistance to TNF may be circumvented by promoting protein phosphorylation with serine-threonine-dependent phosphatase inhibitors, okadaic acid and calyculin.

Recent results showing okadaic acid to mimic TNF- $\alpha$  in inducing a protein phosphorylation pattern and expression of the early response genes in human fibroblasts, as well as those showing TNF- $\alpha$  to stimulate transformation of BALB/3T3 cells, initiated with 3-methylcholantren, allowed to conclude in contrast to earlier suggestions that TNF- $\alpha$  acts as an endogenous tumor promoter.

## LITERATURA

- AGGARWAL B. B., 1992. *Comparative analysis of the structure and function of TNF alfa and TNF beta Immunol. Se.* 56, 61-78.
- AGGARWAL B. B., KOHR W. J., HASS P. E., MOFFAT B., SPENCER S., HENZEL W. J., BRINGMAN T. S., NEDWIN G. E., GOEDEL D. V., HARKIS R. N., 1985. *Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization.* J. Biol. Chem. 260, 2345-2354.
- AGGARWAL B. B., TOTPAL K., AL-OSMAN F., BUDDE J. A., POCSIK E., 1994. *Pp60v-src kinase overexpression leads to cellular resistance to the antiproliferative effects of tumor necrosis factor.* FEBS Lett. 345, 219-224.
- BEYAERT., FIERS W., 1994. *Molecular mechanism of tumor necrosis factor -induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not.* FEBS Lett. 340, 9-14.
- BEUTLER B., VAN HUFFEL C., 1994. *Unraveling function in the TNF ligand and receptor families.* Science, 264, 667-668.
- BOUSSIOTIS V. A., NADLER L. M., STROMINGER J. L., GOLDFELD A. E., 1994. *Tumor necrosis factor alfa is an autocrine growth factor for normal human B cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 7007-7011
- CARSWELL E. A., OLD L. J., KASSEL R. L., GREEN S., FIORE N., WILLIAMSON B., 1975. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72. 3666-3670.
- CEMBRZYŃSKA-NOWAK M., SZKLARZ E., INGLÓT A. D., TEODORCZYK-INJEYAN J. A., 1993. *Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma.* Am. Rev. Respir. Dis. 147, 291-295.

- CONTI P., REALE M., NICOLAI M., BARBACANE R. C., PLACIDO F. C., IANTORNO R., TENEGHA R., 1994. *Bacillus Calamette-Guerin potentiates monocyte response to lipopolisaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1 but not interleukin-6 in bladder cancer patients*. Cancer Immunol. Immunother. 38, 365-371.
- CROWE P. D., VAN ARSDALE T. L., WALTER B. N., WARE C. F., HESSION C., EHRENFELS B., BROWNING J. L., DIN W. S., GOODWIN R. G., SMITH C. A., 1994. *A lymphotoxin-beta specific receptor*. Science, 264, 707-710.
- DOBROWSKY R. T., HANNUN Y. A., 1992. *Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase*. J. Biol. Chem. 267, 5048-5051.
- FUJIKI H., SUGANUMA M., 1994. *Tumor necrosis factor alpha, a new tumor promoter, engendered by biochemical studies of okadaic acid*. J. Biochem. 115, 1-5.
- GUY G. R., CAO X., CHUA S. P., TAN Y. H., 1992. *Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1*. J. Biol. Chem. 267, 1846-1852.
- HIMENO T., WATANABE N., YAMAUCHI N., MAEDA M., TSUJI Y., OKAMOTO T., NEDA H., NIITSU Y., 1990. *Expression of endogenous tumor necrosis factor as protective protein against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor*. Cancer Res. 50, 4941-4945.
- HIGUCHI M., AGGARWAL B. B., 1993. *Okadaic acid induces down-modulation and shedding of tumor necrosis factor receptors*. J. Biol. Chem. 268, 5624-5631.
- HIRU P., ROSENBERG S. A., 1994. *The genetic modification of T cells for cancer therapy; an overview of laboratory and clinical trials*. Cancer Detect. Prev. 18, 43-50.
- HUDZIAK R. M., LEWIS G. D., SHALABY M. R., EESSALU T. E., AGGARWAL B. B., ULLRICH A., SHEPARD H. M., 1988. *Amplified expression of the HER2/ERBB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor alpha in NIH 3T3 cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5102-5106.
- IMAMURA K., SHERMAN M. L., SPRIGGS D., KUFEL D., 1988. *Effect of tumor necrosis factor on GTP binding and GTPase activity in HL-60 and L929 cells*. J. Biol. Chem. 263, 10247-10253.
- ISOBE K., FAN Z., EMI N., NAKASHIMA I., 1994. *Gene transfer of TNF receptor for treatment of cancer by TNF*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202, 1538-1542.
- ISRAEL-BIET D., CADRANEL J., BELDJORD K., ANDRIEU J.-M., JEFFREY A., EVEN P., 1991. *Tumor necrosis factor production in HIV-seropositive subjects. Relationship with lung opportunistic infections and HIV expression in alveolar macrophages*. J. Immunol. 147, 490-494.
- JANICKE R. V., LEE F. H., PORTER A. G., 1994. *Nuclear c-myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells*. Mol. Cell. Biol. 14, 5661-570.
- JARVIS W. D., KOLESNICK R. N., FORNARI F. A., TRAYLOR R. S., GEWIRTZ D. A., GRANT S., 1994. *Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 73-71.
- KIM M.-Y., LINARDIC C., OBEID L., HANNUN Y., 1991. *Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon*. J. Biol. Chem. 266, 484-489.
- LEPPER-WOODFORD S. K., DECLAN CAREY P., BYRNE K., JENKINS J. K., FISCHER B. J., BLOCHER C., SUGERMAN H. J., FOWLER III A. A., 1991. *Tumor necrosis factor. Alpha and beta subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury*. Am. Rev. Respir. Dis. 143, 1076-1082.
- MATHIAS S., DRESSLER K. A., KOLESNICK R. N., 1991. *Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 10009-10013.
- MATSUO S., TAKANO S., YAMASHITA J., OGAWA M., 1992. *Synergistic cytotoxic effects of tumor necrosis factor, interferon-gamma and tamoxifen on breast cancer cell lines*. Anticancer Res. 12, 1575-1579.
- MORINCOLA F. M., ETTINGHAUSEN S., COHEN P. A., CHESHIRE L. B., RESTIFO N.P., MULE J. J., ROSENBERG S. A., 1994. *Treatment of established lung metastases with tumor infiltrating lymphocytes derived from a poorly immunogenic tumor engineered to secrete human TNF alpha*. J. Immunol. 152, 3500-3513.
- NINOMIYA-TSUI J., TORTI F.M., RINGOLD G. M., 1993. *Tumor necrosis factor-induced c-myc expression in the absence of mitogenesis is associated with inhibition of adipocyte differentiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9611-9615.
- PARSONS P. E., MOORE F. A., MOORE E. E., IKLE D. N., HENSOS P. M., WORTHEN G. S., 1992. *Studies on the role of tumor necrosis factor in Adult Respiratory Distress Syndrome*. Am. Rev. Respir. Dis. 146, 694-700.
- SELMAY K. W., FAROOQ M., NORTON W.T., RAINE C. S., BROSNAN C.F., 1990. *Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor*. J. Immunol. 144, 129-135.

- SERFILIPPI G., FERRO T. J., JOHNSON A., 1994. *Activation of protein kinase C mediates altered pulmonary vasoreactivity induced by tumor necrosis factor- alpha*. Am. J. Physiol. 267, L282-L290.
- SMITH C. A., FARRAH T., GOODWIN R. G., 1994. *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation and death*. Cell, 76, 959-962.
- SMITH D.M., TRAN H. M., SOO V. W., McQUISTON S. A., TARTAGLIA L. A., GOEDEL D. V., EPSTEIN L. B., 1994. *Enhanced synthesis of tumor necrosis factor-inducible proteins, plasminogen activator inhibitor-2, manganese superoxide dismutase and protein 28/5.6, is selectively triggered by the 55-kDa tumor necrosis factor receptor in human melanoma cells*. J. Biol. Chem. 269, 9898-9905.
- STEFFEN M., PETERSEN J., OLDIGS M., KARMEIER A., MAGNUSSEN H., THIELE H. G., RAEDLER A., 1993. *Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-beta, and interleukin-6 by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis*. J. Allergy Clin. Immunol. 91, 939-949.
- SUGARMAN B. J., AGGARWAL B. B., HASS P. E., FIGARI I. S., PALLADINO M. A. Jr., SHEPARD H. M., 1985. *Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro*. Science, 230, 943-945.
- TOPALIAN S. D., SALOMON D., ROSENBERG A., 1989. *Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas*. J. Immunol. 142, 3714-3719.
- TRACEY K. J., LOWRY S. F., CERAMI A., 1988. *Cachectin/TNF-alpha in septic shock and septic Adult Respiratory Distress Syndrome*. Am. Rev. Respir. Dis. 138, 137-1379.
- TRACEY K. J., VLASSARA H., CERAMI A., 1989. *Cachectin/tumor necrosis factor*. Lancet, i 1122-1126.
- VIETOR I., SCHWENGER P., LI W., SCHLESSINGER J., VILCEK J., 1993. *Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblasts*. J. Biol. Chem. 268, 18994-18999.
- VILCEK J., LEE T. H., 1991. *Tumor necrosis factor. New insight into the molecular mechanisms of its multiple actions*. J. Biol. Chem. 266, 7313-7316.
- WATANABE N., YAMAUCHI N., MAEDA M., NEDA H., TSUJI Y., OKAMOTO T., TSUJI N., AKIYAMA S., SASAKI H., MITSU Y., 1994. *Recombinant tumor necrosis factor causes regression in patients with advanced malignancies*. Oncology, 51, 360-361.
- WONG H. W., GOEDEL D. V., 1988. *Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism*. Science, 242, 941-943.
- WRIGHT S., ZHENG J., TORTI F. M., LARRICK J. W., 1993. *Role of protein phosphorylation in TNF-induced apoptosis: Phosphatase inhibitors synergize with TNF to activate DNA fragmentation in normal as well as TNF resistant U937 variants*. J. Cell. Biochem. 53, 222-233.
- ZHENG X. M., WANG Y., PALLEN C. J., 1992. *Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase*. Nature, 359, 336-339.