ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 1999. Т. 15. № 4

# Чи регулює окис азоту процес передачі сигналу від фактора некрозу пухлин?

**М. Ю. Оболенська, А. А. Самійленко**

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Огляд присвячено аналізу можливої ролі окису азоту в процесах сприйняття і внутрішньоклітинної передачі сигналу від фактора некрозу пухлин (ФНП). Наведено дані про сумісну участь ФНП і окису азоту в різних фізіологічних та патофізіологічних процесах. Розглядаються альтернативні шляхи передачі сигналу від ФНП, що призводять або до загибелі клітин, або до розвитку компенсаторних реакцій, які забезпечують життєздатність клітин. Детально проаналізовано особливості структури білків — посередників у передачі сигналу від ФНП, які визначають можливість їхньої взаємодії з окисом азоту. На основі здійсненого аналізу і існуючих даних про взаємодію деяких посередників з окисом азоту висловлюється припущення стосовно участі окису азоту в прояві різноманітних функцій ФНП.*

Вступ. Фактор некрозу пухлин $\alpha$ (ФНП-$\alpha$, TNF-$\alpha$) та лімфотоксин $\alpha$, або фактор некрозу пухлин $\beta$ (ФНП-$\beta$, LT-$\alpha$/TNF-$\beta$) є спорідненими цитокінами, які продукуються відповідно макрофагами і лімфоцитами, взаємодіють з одними і тими ж поверхневими рецепторами клітин багатьох типів і мають схожі біологічні властивості. Цитокіни ФНП-$\alpha$ і ФНП-$\beta$ виступають як цитотоксини і спричиняють апоптоз або некроз клітин, мають антивірусну активність і регулюють імунну відповідь хазяїна, опосередковують септичний шок і розвиток запальних процесів, зумовлюють синдром глибокого виснаження або кахексію та опосередковують відповідь гострої фази, сприяють проліферації одних клітин та гальмують розмноження інших [1—4]. Прояв тієї чи іншої функції ФНП залежить від багатьох факторів, передусім від того, в якій кількості і в якому контексті (природа одночасно діючих факторів) діє ліганд на клітину-мішень, з якими специфічними рецепторами він взаємодіє і наскільки ефективно зовнішньоклітинний сигнал передається різними шляхами і численними посередниками внутрішньоклітинним міше-ням. Безумовно, що від природи клітин-мішеней суттєво залежать перелічені фактори. Зважаючи на важливу роль, яку посідає ФНП у фізіологічних та патологічних процесах, з'ясування різних аспектів механізму його дії видається необхідним, особливо для удосконалення дієвого втручання в патологічні процеси і їхнє лікування.

© М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА, А. А. САМІЙЛЕНКО, 1999

Серед багатьох речовин, які можуть впливати на кінцевий результат дії ФНП, нашу увагу привертає окис азоту — проста неорганічна сполука з високою реакційною здатністю. Як і ФНП [5], окис азоту є еволюційно давнім регулятором внутрішньоклітинних процесів і міжклітинного спілкування [6], що діє шляхом утворення ковалентних зв'язків з реагуючими речовинами. Він змінює проходження багатьох біохімічних реакцій і активність численних біологічних сполук, особливо тих, в яких беруть участь або містяться комплексно зв'язані атоми/іони перехідних металів заліза, цинку, міді, молекули кисню або функціонально активні SH-групи, або супероксид ( $O^-_2$) [7—11]. Згідно з деякими припущеннями, окис азоту може передавати всередині клітини зовнішньоклітинний сигнал [12, 13]. На відміну від фосфокіназ, які, передаючи сигнал, каталізують фосфорилювання білків, NO змінює функціональну активність білків внаслідок неферментативної взаємодії з ними.

Окис азоту утворюється із термінального гуанідинового атома азоту L-аргініну та молекулярного кисню за допомогою ферменту NO-синтази

(NO-synthase, NOS, КФ 1.14.13.39) [14, 15]. За характером експресії ферменту розрізняють його конститутивні (нейронна і ендотеліальна) і індуковану ізоформи. Перші для повної активності потребують кальмодулін, з яким миттєво взаємодіють при підвищенні внутрішньоклітинної концентрації іонів $Ca^{2+}$. Конститутивні ізоформи короткочасно (секунди—хвилини) продукують невеликі (пікомолярні) кількості NO. Індукована ізоформа ферменту утворює тривкий комплекс з молекулою кальмодуліна в присутності низької концентрації іонів $Ca^{2+}$. Ізоформа NO-синтази з індукованою експресією продукує NO протягом тривалішого часу (хвилини—години) і в більшій (наномолярній) кількості. Наявна кількість фермента і тривалість його дії залежать від природи клітини-продуцента [9, 10].

Окис азоту і ФНП виявляють деякі однакові біологічні властивості, наприклад, обидва захищають організм від утворення пухлин, пригнічують синтез негативно регульованих білків гострої фази — альбуміна та фібриногена, інактивують цитохром Р-450 тощо [4, 16, 17]. У деяких випадках окис азоту протидіє ФНП. Детальніше співвідношення біологічних активностей обох сполук буде проаналізовано нижче. Привертає увагу також той факт, що в клітинах деяких типів ФНП стимулює синтез NO [18], тоді як останній зумовлює підвищеня синтезу ФНП [19].

Питання полягає в тому, чи діють речовини ФНП і NO паралельно одна одній, використовуючи різні мішені, або ФНП та сполуки, що передають його сигнал, і окис азоту безпосередньо взаємодіють згідно зі своїми хімічними властивостями. Аналізу цього питання і присвячено даний огляд.

**ФНП і NO: синергізм і антагонізм дії.** Як зазначено вище, ФНП і NO беруть участь у численних і різноманітних процесах. У контексті даного огляду будуть розглянуті ті процеси, до яких причетні обидві речовини. ФНП і NO виявляють цитотоксичні властивості, тобто спричиняють загибель клітин. У залежності від природи і функціонального стану клітин ФНП викликає геморагічний некроз або апоптоз. Некроз характеризується набуханням клітин, їхньою деструкцією і лізисом. При апоптозі клітини зморщуються, в цитоплазмі з'являються характерні тільця із конденсованого матеріалу, а в ядрах відбувається фрагментація хроматину. Незважаючи на свою назву, ФНП здатний виявляти цитотоксичну дію стосовно обмеженої кількості пухлин і ліній трансформованих клітин [20]. Вірогідність загибелі як нормальних, так і трансформованих клітин під дією ФНП значно зростає в умовах блокади або білкового синтезу (наприклад, циклогексимідом), або транскрипції (наприклад, актиноміцином Д) [21], а також у присутності деяких інших цитокінів (наприклад, інтерферону-$\gamma$) чи хіміотерапевтичних засобів [22].

Доведено, що за процес апоптозу відповідають декілька речовин, що утворюються на шляхах внутрішньоклітинної передачі сигналу від ФНП. Першорядне значення відіграє каскад протеазних реакцій, який розпочинається активацією ферменту каспази-8 [23]. Крім того, розвиткові апоптозу сприяють речовини, які утворюються або активуються внаслідок дії ФНП: ейкозаноїди або окислені метаболіти арахідонової кислоти, реактивні продукти кисню (reactive oxygen intermediates) та окису азоту (nitric oxide intermediates), полі(ADP-рибоза)полімераза (ADPRP, КФ 2.4.2.30).

Остання каталізує ДНК-залежний перенос ADP-рибози від НАД до ядерних білків і тим самим виснажує клітинні запаси НАД і АТР. Крім безпосередньої дії на клітину-мішень ФНП може сприяти загибелі клітин опосередковано, індукуючи в клітинах імунної системи синтез відповідних цитотоксинів [22, 24—28].

Цитотоксичні властивості окису азота відомі теж давно [29]. Бактерії, простіші, грибки, трансформовані клітини гинуть під дією NO [9]. Наприклад, окис азоту стоїть на перешкоді малігнізованим клітинам, які в невеликій кількості постійно утворюються в організмі ссавців. Поступаючи з кров'ю до печінки, ці клітини зтикаються з непаренхімними клітинами печінкового синусоїда, серед яких клітини Купфера або осілі макрофаги печінки знищують трансформовані клітини за допомогою, зокрема, окису азоту [30, 31].

Припинення окислювального фосфорилювання внаслідок блокади переносу електронів дихальними ансамблями мітохондрій, вичерпання клітинних запасів АТР і НАД через активацію полі(ADP-рибоза)полімерази стають основною причиною загибелі клітин-мішеней в результаті цитотоксичної дії NO [9].

Фактор некрозу пухлин і окис азоту разом виступають як медіатори всілякого роду запалень: гострого та хронічного, генералізованого та місцевого, спричиненого мікроорганізмами, цитотоксинами і сигналами від пошкоджених клітин (гістамін, нуклеотиди, олігопептиди, протеолітичні ферменти). По суті своїй запалення є сукупністю захисних реакцій організму, спрямованих на його виживання. Недостатня реакційна здатність організму призводить до хронічного запалення із тривалою дією патогенного фактора, а перевищення відповідних реакцій — до небезпечних для жит-

тя ситуацій, прикладом яких є септичний шок. Типовими проявами запалення є розширення і підвищена проникність кровоносних судин, інвазія лейкоцитів в уражену ділянку і наступне порушення або втрата клітинами їхніх фізіологічних функцій [32].

Провідну роль у запаленні виконують клітини ретикулоендотеліальної системи (за визначенням Людвіга Ашофа, 1922), до яких належать: клітини системи мононуклеарних фагоцитів (циркулюючі і осілі макрофаги, моноцити і нормальні кілери); поліморфноядерні лейкоцити, лімфоцити, тучні- і ендотеліальні клітини, фібробласти і тромбоцити. Першу і основну перешкоду речовинам, що спричинюють запалення, становлять макрофаги крові і осілі макрофаги печінки — клітини Купфера. Останні утворюють найбільший пул макрофагів в організмі (біля 80 %) і поглинають майже всю кількість ендотоксину [33]. Контакт макрофагів із збудниками запального процесу є початком відповіді організму [32]. Макрофаги синтезують цитокіни, біологічно активні метаболіти арахідонової кислоти та окис азоту [32, 34]. Основне місце серед прозапальних цитокінів посідає ФНП-$\alpha$. Миші, в клітинах яких заблоковано експресію рецептора 1 до ФНП (РФНП1), виявляються стійкими до ендотоксичного шоку, спричиненого ліпополісахаридами або *Staphylococcus aureus* [35]. ФНП стимулює синтез молекул адгезії і хемоаттрактантів: внутрішньоклітинних молекул адгезії лейкоцитів (intracellular-leukocyte adhesion molecule), ендотеліальних молекул адгезії лейкоцитів (endothelial leukocyte adhesion molecule), молекул адгезії судинних клітин (vascular cell adhesion molecule), інтерлейкіна-8, який спричиняє рухливість і взаємодію поліморфноядерних лейкоцитів з ендотелієм з наступним проникненням лейкоцитів крізь стінку венозних капілярів. ФНП-$\alpha$ стимулює також синтез окису азоту, ейкосаноїдів (простагландин $E_2$ зумовлює біль і підвищену температуру тіла), індукує експресію цитокінів і, зокрема, інтерлейкіна-6, який є ведучим посередником реакції гострої фази; стимулює синтез активуючого фактора тромбоцитів і тим зумовлює їхню агрегацію, викликає метаболічні зміни, спрямовані на максимальне використання енергетичних можливостей уражених клітин, стимулює синтез білків теплового шоку тощо [27, 32, 34].

Зростання синтезу окису азоту при запаленнях найвиразніше виявляється у підвищенні концентрації продуктів окислення NO, нітритів і нітратів, у крові і в сечі. Кількість утворюваного NO корелює із підвищенням загальної температури тіла [9, 36]. Окис азоту активно розширює судини в місці запалення і в цілому організмі [37], підвищує проникність судинної стінки [38] і сприяє утворенню набряків [39].

Блокада синтезу окису азоту при запаленнях має двоякі наслідки — покращання або погіршення запального процесу. Наприклад, при септичному шоці блокада діє позитивно, оскільки в першу чергу звужуються кровоносні судини і підвищується кро'яний тиск [40]. Пригнічення синтезу NO при запаленні печінки поліпшує детоксикаційну функцію органу [41]. На противагу цьому, окис азоту може бути корисним при запаленні. Він зменшує адгезію тромбоцитів і лейкоцитів, агрегацію тромбоцитів, підвищує стійкість печінки і слизової оболонки тонкого кишечника до ендотоксину [42—44], стимулює експресію білків теплового шоку [45, 46]. Таким чином, під час запальних процесів разом з ФНП активно діє NO і виявляє як проти-, так і прозапальні властивості.

ФНП і окис азоту відіграють певну роль у проліферації клітин. Поряд з цитостатичною і цитотоксичною дією ФНП виступає в ролі стимулятора проліферації переважно нетрансформованих клітин [47]. Він безпосередньо індукує експресію генів, причетних до проліферації, а також діє опосередковано через інші мітогенні фактори. Наприклад, ФНП позитивно регулює експресію протоонкогенів *c-jun* [48], *c-fos* і *c-myc* [49], а також експресію фактора росту гепатоцитів (hepatocyte growth factor) і рецепторів до епідермального й трансформуючого факторів росту (epidermal growth factor; transforming growth factor) [50—52]. Промітогенна активність ФНП зумовлює його непересічну роль у процесі регенерації печінки [52—54]. Миші, у яких штучно вилучений ген, кодуючий РФНП1 (55 кДа), характеризуються значно уповільненим процесом відбудови печінки після резекції 2/3 органу [54]. Одночасно з підвищеною експресією ФНП у регенеруючій печінці і, ймовірно, внаслідок її збільшується продукція окису азоту протягом фази G1 першого клітинного циклу гепатоцитів [55, 55]. На моделі регенеруючої печінки щурів показано, що коливання синтезу NO корелюють з фазами клітинного циклу. У гепатоцитів, клітин Купфера і ендотеліальних клітин печінки після часткової гепатектомії продукція NO збільшена протягом G1- і G2-фаз і зменшена протягом S-фаз клітинних циклів перелічених клітин [55, 56].

Співучасть ФНП і NO в одних і тих же процесах може бути зумовлена тим, що обидві речовини мають деякі спільні індуктори (наприклад, ендотоксини при запаленнях індукують синтез ФНП і NO), а також можуть взаємно регулювати

синтез одне одного. Доведено, що ФНП активно індукує синтез NO-синтази в клітинах ендотелію судин [25] і епітелію канальців сім'яників [57], у клітинах гладеньких м'язів товстої кишки [58] і в гепатоцитах [18], у мезенгіальних клітинах клубочків нирок [59] і в ендотелії печінки і легень при запаленнях [60], в адипоцитах бурої жирової тканини [61]. ФНП позитивно регулює імпорт у клітину вихідної речовини для синтезу NO — аргініну, посилюючи експресію його білка-переносника — катіонного переносника амінокислот (cationic amino acid transporter) [62]. Окис азоту, в свою чергу, індукує експресію гена ФНП, що показано на нейтрофілах і моноцитах периферійної крові [19, 63] та культурі клітин мієлоїдної лейкемії людини [64]. Для моноцитів периферійної крові людини також виявлено пригнічення синтезу ФНП під впливом NO [65].

Таким чином, співучасть ФНП і NO в багатьох процесах і їхня взаєморегуляція дають підставу для припущення про можливий вплив NO на процес передачі сигналу від ФНП до його внутрішньоклітинних мішеней.

**Взаємодія ФНП з рецепторами і передача сигналу внутрішньоклітинними посередниками.** Фактор некрозу пухлин проявляє свою біологічну активність у вигляді декількох гомотримерів $(ФНП\text{-}\alpha)_3$ і $(ФНП\text{-}\beta)_3$, подібних за будовою та розмірами [66, 67]. За даними кристалографії, тример $(ФНП\text{-}\beta)_3$ має форму усіченої піраміди висотою 6 і діаметром 5 нм на основі і 3 нм на вершині [67, 68]. Тримери взаємодіють з поверхневими рецепторами двох типів — РФНП1 і РФНП2 довжиною відповідно 426 і 439 амінокислотних залишків і масою 55 і 75 кДа (рис. 1). Обидва рецептори — це трансмембранні глікопротеїни, зовнішньоклітинні частини яких високогомологічні, а внутрішньоклітинні частини різні. Взаємодія тримера ліганда з рецепторами викликає тримеризацію рецепторів [69]. У комплексі ліганд—рецептор вершина піраміди ліганда спрямована до поверхні клітини, а три зовнішньоклітинні частини тримеризованого рецептора охоплюють на рівній відстані одна від одної піраміду ліганда і не контактують між собою. Остаточно не з'ясовано можливість контактів між проксимальними до мембрани ділянками зовнішньоклітинних частин рецепторів [67].

Комплекс ФНП—РФНП інтерналізується клітиною-мішенню, транспортується в ендосоми і гідролізується там. Рецептори ФНП у більшості клітин не використовуються вдруге, а утворюються *de novo* [70, 71].

Зовнішньоклітинна частина РФНП, а, втім, і інших представників родини білків, до якої належать обидва РФНП, складається з чотирьох доменів. Кожний домен має консенсусний мотив з шістьма цистеїнами: $Cys1—X_{10-20}—Cys2—X_{0-2}—Cys3—X_{1-2}—Cys4—X_{5-15}—Cys5—X_{3-8}—Cys6$, де $X_{n-m}$ означає кількість проміжних амінокислот [67]. Цистеїни чотирьох доменів, за винятком чотирьох цистеїнів, найближчих до клітинної мембрани, утворюють дісульфідні містки — Cys1—Cys2—Cys3—Cys5 і Cys4—Cys6. Ці містки зумовлюють жорстку структуру зовнішньоклітинних частин рецепторів, яка зберігається при взаємодії з лігандом [67, 72]. Комплекс ліганд—рецептор підтримується гідрофільними і гідрофобними зв'язками між певними ділянками тримера ліганда і трьома місцями кожної з трьох зовнішньоклітинних частин тримера рецептора [67].

У структурі внутрішньоклітинних частин рецепторів за функціональними ознаками розрізняють декілька доменів. Найвивченішим є «домен смерті». Він має довжину близько 80 амінокислотних залишків і розташований на С-кінці рецептора РФНП1 [69, 73]. Цей домен зумовлює цитотоксичні функції ФНП і його антивірусну активність. Крім того, «домен смерті» опосередковує індукцію NO-синтази [73], активацію кислої сфінгомієлінази ендосом і індукцію гена хемокіна інтерлейкіна-8 [74]. З «доменом смерті» пов'язана ще одна функція мономерів рецептора — їхня здатність до асоціації, що при збільшеній продукції рецепторів навіть за відсутності ліганда може спричиняти апоптоз [74, 75]. При низькій щільності рецепторів на поверхні клітини (< 50 рецепторів на клітину) взаємодія «доменів смерті» полегшує асоціацію рецепторів і сприяє їхній тримеризації [69].

У проксимальній до мембрани цитоплазматичній частині рецептора РФНП1 розрізняють ще два домени. Один з них знаходиться поряд з «доменом смерті» і бере участь в індукції NO-синтази [74]. Інший є необхідним і достатнім для ініціації каскаду посередників за участю нейтральної сфінгомієлінази [76—78]. Останній домен має довжину від 309 до 319 амінокислотних залишків, межує з N-кінцем «домена смерті» (N- і C-кінці молекули рецептора відповідають зовнішньо- і внутрішньоклітинним кінцям молекули) і зумовлює прозапальні властивості ФНП [78].

У рецепторі 2 до ФНП мутаційний аналіз виявив С-термінальний район із 78 амінокислотних залишків, який опосередковує взаємодію з цитоплазматичними факторами і передачу сигналу [79].

Жоден з рецепторів ФНП, як і всі представники його надродини, не має тирозинкіназної актив-

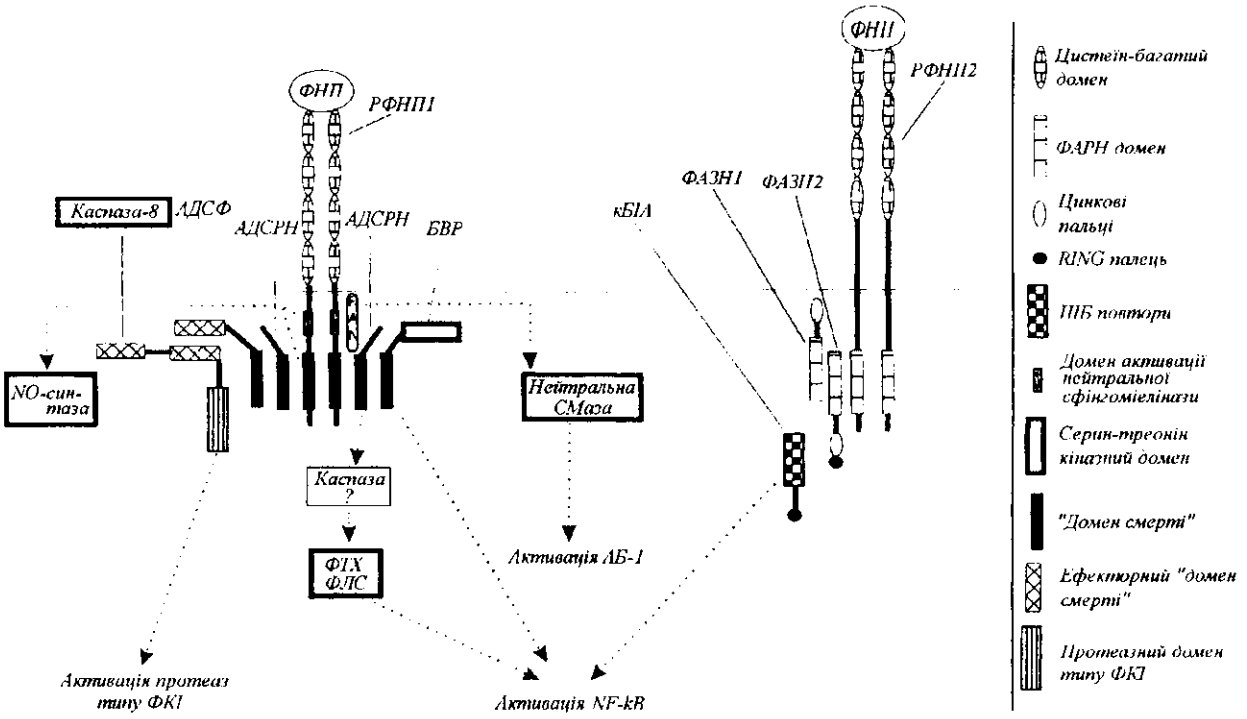


Рис. 1. Початкові етапи передачі сигналу від ФНП. Розташування об'єктів на схемі умовне і не відповідає їхньому положенню в клітині

ності, і передача сигналу опосередковується асоційованими з рецепторами білками. Першим було знайдено білок АДСРН, який асоціює з «доменом смерті» рецептора РФНП1 (англ. TRADD, TNFR55-associated death domain protein) [80]. Білок АДСРН, як і РФНП1, експресується в більшості тканин, але в незначній кількості. На С-кінці білка розташований «домен смерті», який має довжину 111 амінокислотних залишків і на 23 % ідентичний «домену смерті» РФНП1. «Домен смерті» білка АДСРН забезпечує його взаємодію з «доменом смерті» РФНП1 [80, 81]. Білок АДСРН опосередковує, принаймні, два шляхи внутрішньоклітинної передачі сигналу від РНФП1. На одному шляху активується транскрипційний фактор NF-κB, на другому — протеазний каскад. Від ефективності передачі сигналу ФНП обома шляхами залежить вибір клітини між життям і смертю [80—83]. Суттєво, що вибір здійснюється на рівні активації/інактивації білків, асоційованих з рецептором РФНП1, а не на рівні їхньої асоціації/дисоціації. Власне асоціація білків відбувається під впливом ФНП.

У разі апоптозу активується білок АДСФ, який отримав свою назву через здатність асоціюватися з «доменом смерті» білка Fas (англ. FADD, Fas-associted death domain protein). Білок має молекулярну масу 23,3 кДа і асоціюється власним «доменом смерті» з таким білка АДСРН [84, 85]. «Домен смерті» білка АДСФ знаходиться на його С-кінці. На N-кінці білка розташований домен — «ефектор смерті», який в свою чергу реагує із схожим доменом білка каспази-8 — цистеїнової протеази, що стоїть на початку протеазного каскаду реакцій (інша назва каспази-8 — FLICE, FADD-like interleukin-1β-converting enzyme) [23]. Білок каспаза завдяки наявності в його структурі протеазного домена з'єднує комплекс білків, сигналізуючих про дію ФНП, з протеазами і зумовлює апоптоз клітин [83].

В разі виживання клітини під дією ФНП активується інший білок, асоційований з білком АДСРН, — білок БВР (білок, що взаємодіє з рецептором, англ. RIP, receptor interacting protein). Білок БВР, 76 кДа, має три функціональні домени. На С-кінці розташований «домен смерті», яким білок БВР приєднується до білка АДСРН. На N-кінці розташований домен, що виявляє кіназну активність. Послідовність між обома зазначеними доменами необхідна для активації транскрипційного фактора NF-$\kappa$B [83]. Не виключено, що наведені відомості про два шляхи передачі сигналу від білка АДСРН спрощено відображають процеси, які відбуваються в клітині при виборі між життям і смертю. Наприклад, у високочутливих до дії ФНП клітинах мишачої фібросаркоми лінії WEHI164 звільнення транскрипційного фактора NF-$\kappa$B із його цитоплазматичного комплексу з інгібітором і перехід фактора в ядро є необхідними етапами, передуючими загибелі клітини [86].

Для передачі сигналу від домена рецептора РФНП1, який відповідає за активацію нейтральної сфінгомієлінази (ДНС), необхідним і достатнім виявляється безпосередній зв'язок з доменом білка FAN [87].

Іще одну групу білків, що асоціюють з рецепторами ФНП, утворюють білки групи ФАРН (фактор асоціації з рецептором некрозу пухлин, англ. TRAF, TNF-receptor associated factor) [81, 83]. Білки ФАРН були вперше виявлені завдяки їхній специфічній здатності зв'язуватися з рецептором РФНП2 через наявний у всіх білків родини ФАРН ФАРН-домен [79]. Два білки, ФАРН1 і ФАРН2, причетні до передачі сигналу від ФНП. ФАРН2 взаємодіє у вигляді гетеродимера ФАРН2/ФАРН1 з РФНП2 і у вигляді мономера — з N-термінальним доменом білка АДСРН. Таким чином, для двох рецепторів, 55 і 75 кДа, ФАРН2 опосередковує спричинену ФНП активацію фактора NF-$\kappa$B [88].

Структурні особливості білків типу ФАРН2 наводяться на прикладі білка людини (501 амінокислотний залишок, 56 кДа) [89]. N-кінцева частина білка збагачена гістидином та цистеїном. Між 34-м та 72-м амінокислотними залишками знаходиться послідовність Cys—$X_2$—Cys—$X_{11}$—Cys—X—His—$X_2$—Cys—$X_2$—Cys—$X_{11}$—Cys—$X_2$—Cys. Ця послідовність має два місця зв'язування атомів Zn і утворює модифіковану структуру Zn-пальця —RING-палець [90]. В інтервалі між 117-м та 243-м амінокислотними залишками знаходяться п'ять мотивів Cys/His—$X_{2-4}$—Cys/His—$X_{2-13}$—Cys/His—$X_{2-4}$—Cis/His, які утворюють п'ять структур типу Zn-палець. Ці структури схожі з Zn-пальцями фактора транскрипції 5S рРНК у *Xenopus laevis*, TFIIIA [91]. На С-кінці білка ФАРН знаходиться ФАРН-домен. Оскільки структури типу Zn- і RING-пальців характерні для білків, здатних взаємодіяти з білками, ДНК і РНК [92], то наявність таких структур у білку ФАРН2 вказує на його функціональні можливості. Не виключено, що білок ФАРН2 може сам передавати сигнал в ядро по аналогії з білком STAT (signal transducer and transforming factor), який опосередковує дію багатьох цитокінів [93].

Як уже зазначалося, від білків, безпосередньо асоційованих/зв'язаних з рецепторами, сигнал передається наступним посередникам, доки не досягає кінцевої мішені. Відомі посередники і їхня взаємодія при передачі сигналу від ФНП наведені на рис. 1 і 2.

Згідно з існуючими даними, від білків, асоційованих з рецептором РФНП1, сигнал може розповсюджуватися чотирма шляхами: через каспазу-8 та ферменти, конвертуючі інтерлейкін-1$\beta$ (ФКІ, англ. ICE, interleukin-1-$\beta$ converting enzymes) [23, 94]; через неідентифіковану каспазу і далі через фосфатидилхолін-фосфоліпазу С (ФТХ-ФЛС, англ. phosophatidylcholine-specific phospholipase C) і кислу сфінгомієліназу (кисла СМаза, англ. acid sphingomyelinase [95]; через нейтральну сфінгомієліназу (нейтральна СМаза, англ. neutral sphingomyelinase), фосфоліпазу $A_2$ і ейкосаноїди [28]; через синтазу окису азоту [74]. У двох із названих шляхів беруть участь сфінгомієлінази, які каталізують утворення церамідів — ліпідних медіаторів. Функціональна активність церамідів залежить від топології їхнього утворення [74]. Цераміди, які утворюються в мембрані внаслідок розщеплення сфінгомієлінів СМазою, активують асоційовану з мембраною специфічну протеїнкіназу [96], а цераміди, які утворюються в цитоплазмі внаслідок дії кислої СМази, активують розташовану в цитоплазмі протеїнфосфатазу 2А [97].

Передача сигналу від РНФП2 здійснюється через гетеродимер ФАРН2/ФАРН1 і клітинні білки з родини інгібіторів апоптозу кБІА (англ. cIAP, celluar inhibitor of apoptosis protein) — кБІА1 і кБІА2 [83, 98]. Білок ФАРН1, як і всі білки родини ФАРН, має ФАРН-домен, але на відміну від білка ФАРН2 не має структури типу RING-пальця [99]. Білки кБІА зв'язуються з гетеродимером ФАРН2/ФАРН1 трьома багатими на цистеїн послідовностями ПІБ (повтори БІА бакуловірусів; англ. BIR, baculovirus IAP repeat), які розташовані на N-кінці білка сБІА [100].

Окрім наведених у тексті і в рисунках посередників, відомі також: білок Каспер (англ. Casper),

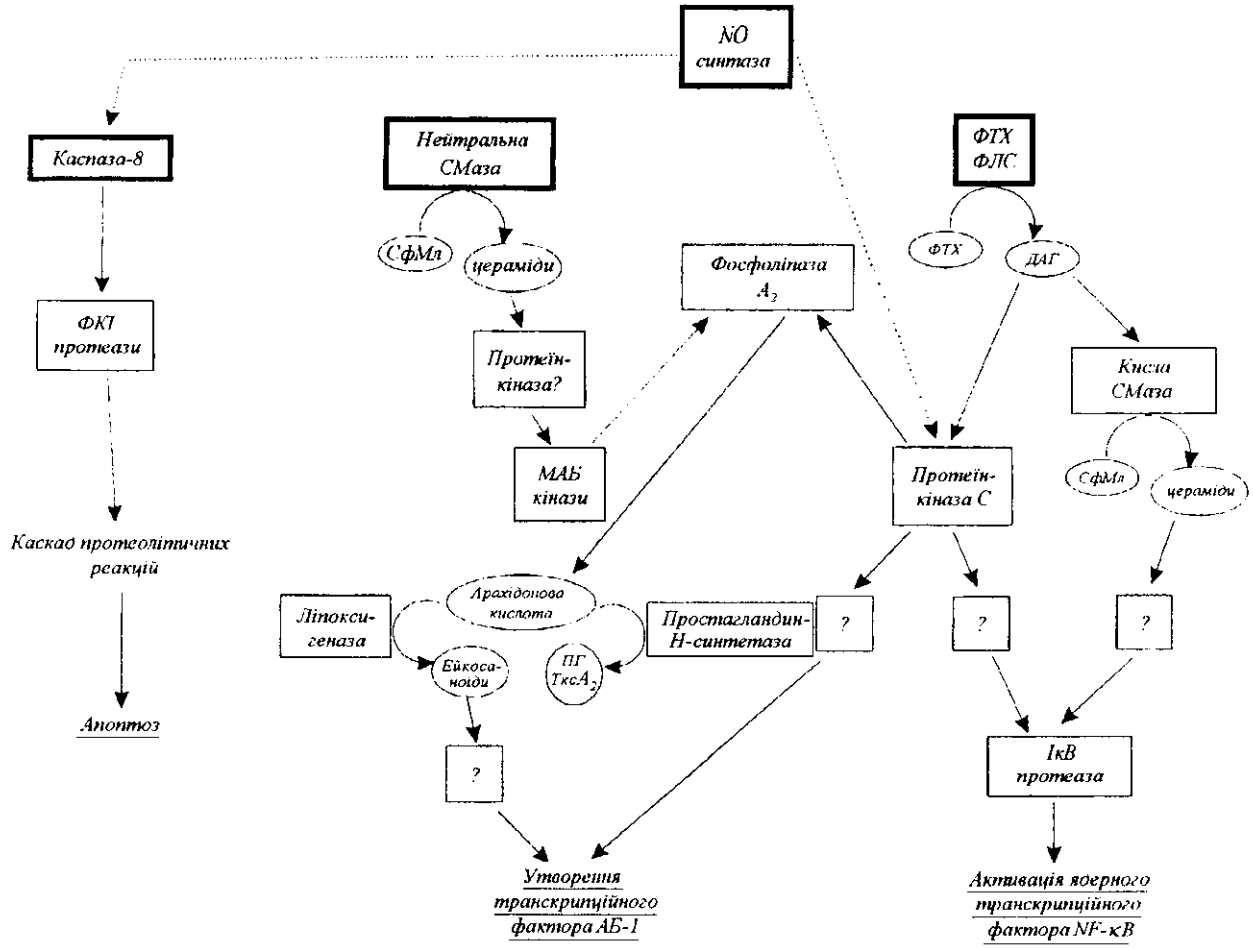


Рис. 2. Подальші етапи передачі сигналу від ФНП

який сигналізує про апоптоз і здатний взаємодіяти з білками АДСФ, каспазою-3, каспазою-8, ФАРН1 і ФАРН2 [101]; білок ФПМА-1 (АДСФ-подібна молекула, що протидіє апоптозу, англ. FLAME-1, FADD-like anti-apoptotic molecule), який скасовує сигнал про апоптоз [102]; білок А20, до складу якого входить структура Zn-пальця і який взаємодіє з гетеродимером ФАРН1/ФАРН2 і пригнічує активацію фактора NF-κB. Синтез білка індукується ФНП [103]; білок АФНК (асоційований з ФАРН активатор NF-κB, англ. TANK, TRAF-associated NF-κB activator), який виконує подвійну функцію. Його N-кінець негативно, а С-кінець позитивно впливають на передачу сигналу від ФАРН до фактора NF-κB [104]. Послідовність і природа всіх реакцій, що зумовлюють передачу сигналу від ФНП, ще не остаточно з'ясовані.

Під час передачі сигналу різними шляхами сигнал може бути модифікований або його розповсюдження може бути припинено.

**Потенційні мішені для окису азоту на шляхах передачі сигналу від ФНП.** У живих системах відомі численні і різноманітні молекулярні мішені для окису азоту. До них належать речовини, що мають у своєму складі атоми або групи атомів, здатні реагувати з окисом азоту, а саме — комплексно зв'язане залізо, залізо-сірчані кластери, тирозильні радикали, сульфгідрильні групи, комп-

лексно зв'язані атоми міді і цинку. Крім того, супероксиданіон $O_2^-$ та ДНК також можуть виступати мішенями для NO [7, 8, 10, 11]. Іноді окис азоту бере участь у послідовних реакціях з різними радикалами/атомами однієї і тієї ж речовини. Наприклад, NO пригнічує певні гем-вмісні ізоферменти Р-450, і реакція проходить у дві стадії. На першій стадії NO реагує з гемом ізоферменту, на другій стадії відбувається необоротна кисень-залежна реакція нітрування тирозину в активному центрі ферменту [105].

За фізіологічних умов і в присутності кисню значну роль у функціонуванні клітини відіграє реакція NO з SH-групами білків і, в першу чергу, з тіоловими радикалами цистеїнових залишків, внаслідок чого утворюються S-нітрозотіоли білків [12]. За таким механізмом знижується тирозинкіназна активність рецептора до фактора росту епідерміса [106], інактивується гліцеральдерід-3-фосфатдегідрогеназа [107], підвищується активність тканинного активатора плазміногена [108] і білка $p21^{ras}$ з родини G-білків [109].

При певних умовах близько розміщені нітрозильовані SH-групи одного чи кількох білків здатні утворювати інтра- та інтермолекулярні дисульфідні зв'язки [110, 111]. За таким механізмом інактивуються: протеїнкіназа С, що містить дві багаті на цистеїн ділянки, одна з яких представлена цинковими пальцями, та цистеїновий залишок у ймовірному сайті зв'язування АТР [112]; рецептори до N-метил-D-аспартату в нейронах [113]; низькомолекулярна фосфорибозилпротеїнфосфатаза [13, 114].

Особливо чутливими до окислення є щільно розміщені залишки цистеїну в структурах типу Zn- та RING-пальців, а також Lim-мотиви [10, 115]. З цими структурами окис азоту реагує через атом Zn, порушуючи координаційні зв'язки Zn з залишками цистеїну, вивільняючи атом Zn з утворенням S-нітрозотіолів і таким чином сприяючи наступному формуванню дисульфідних зв'язків [116]. Відомо, що за таким механізмом пригнічується здатність LAC9, одного з транскрипційних факторів дріжджів, зв'язуватися з ДНК [116], знижуються репаративна активність формамідопіримідин-ДНК-гліколіази [117] і каталітична активність алкогольдегідрогенази [10, 118].

Виходячи з даних про реакційну здатність NO та про структуру ФНП і сполук, що опосередковують передачу його сигналу внутрішньоклітинним мішеням, проаналізуємо, чи є серед цих сполук можливі кандидати для безпосередньої взаємодії з NO. Нижче наведено важливі для взаємодії з окисом азоту структурні особливості рецепторів та внутрішньоклітинних посередників передачі сигналу від ФНП (зірочкою позначено сполуки, для яких взаємодію з окисом азоту доведено).

Послідовності, багаті на цистеїн:
- Протеїнкіназа С*
- РФНП1
- РФНП2
- кБІА

Функціонально активні сульфгідрильні групи:
- Фосфотирозинпротеїнфосфатаза*
- Каспази*
- Протеїнкіназа С*

Цинкові пальці:
- Протеїнкіназа С*
- Полі(ADP-рибоза)полімераза
- ФАРН1
- ФАРН2
- Білок А20

RING-пальці:
- Полі(ADP-рибоза)полімераза
- ФАРН2
- кБІА

Комплексно зв'язане залізо:
- Ліпоксигеназа
- Простагландин-Н-синтетаза.

Потенційні сайти зв'язування NO на самих молекулах ФНП, очевидно, відсутні. ФНП-$\alpha$ має в своїй структурі один дисульфідний зв'язок [119], а зрілий ФНП-$\beta$ не містить жодного залишка цистеїну [120]. Що стосується рецепторів до ФНП, то їхні зовнішньоклітинні частини молекул, навпаки, надзвичайно багаті на залишки цистеїну (24 залишки). Десять дисульфідних зв'язків підтримують жорстку структуру зовнішньоклітинної частини кожного мономера рецепторів до ФНП. Оскільки рецептори до ФНП у більшості клітин не рециркулюють, то можна припустити, що окис азоту, який продукується одночасно з молекулами рецепторів до ФНП, сприяє згортанню молекул рецепторів і формуванню структури вищого порядку шляхом утворення дисульфідних зв'язків. Про значення, яке відіграють дисульфідні зв'язки в згортанні молекул білка, див. [121].

Контакти тримера ліганда з тримером рецептора підтримуються за рахунок гідрофобних і гідрофільних зв'язків, до яких NO, ймовірно, не має відношення. Подальше розповсюдження сигналу відбувається через асоційовані білки, серед яких особливу увагу в контексті даного огляду привертають білки ФАРН2, кБІА і білок А20. Ці білки причетні до передачі сигналу від ФНП до транскрипційного фактора NF-$\kappa$B: білок ФАРН2 опосередковує сигнал від обох рецепторів РФНП1 і

РФНП2, тоді як білок кБІА — тільки від РФНП2; білок А20 взаємодіє з гетеродимером ФАРН2/ФАРН1 і виступає як інгібтор активації фактора NF-κB. Ці три білки багаті на Cys-мотиви. Білок ФАРН2 має п'ять структур типу Zn-палець і одну структуру типу RING-палець, білок кБІА має одну структуру типу RING-палець і три цистеїн-багаті послідовності ПІБ, а білок А20 має Zn-палець на функціонально значущому С-кінці. Зважаючи на особливу чутливість вищезгаданих структур до окислення під дією окису азоту (див. вище), перелічені речовини можна вважати потенційними мішенями для дії NO. Окис азоту інактивує ще один фермент, причетний до передачі сигналу від ФНП, — низькомолекулярну фосфотирозинпротеїнфосфатазу, що має високореактивні тіолові групи в активному центрі ферменту [114]. Нещодавно отримані факти свідчать про суттєву роль фосфотирозинфосфатази в активації транскрипційного фактора NF-κB і в модуляції росту внаслідок дії ФНП. Блокада цього ферменту обумовлює специфічне фосфорилювання тирозину-331 у «домені смерті» рецептора РФНП1 і інактивацію асоційованої з рецептором серин/треонінкінази р60КАРН (кіназа, асоційована з рецептором ФНП, англ. р60TRAK) [122].

На подальших шляхах розповсюдження сигналу від ФНП окис азоту може регулювати активність протеїнкінази С (див. вище) і полі(ADP-рибоза)полімерази. Остання має в своєму складі Zn/RING-пальці [123]. Відомо, що нетривале утворення NO в клітині оборотно інактивує протеїнкіназу С, а хронічне — необоротно, що може бути одним з механізмів альтернативної дії окису азоту на фермент і на його здатність передавати сигнал від ФНП [112].

Окис азоту взаємодіє з залізом негемових білків ліпоксигенази (КФ 1.13.11.12) і простагландин-Н-синтетази (КФ 1.14.99.1) [7], які каталізують утворення ейкосаноїдів.

Програма «самогубства» клітин, принаймні, ендотеліальних клітин пуповини людини скасовується через нітрозилювання білків родини каспази [124].

Окис азоту активує транскрипційний фактор АБ-1 [125] і сприяє транслокації траскрипційного фактора NF-κB в ядро [126]. Привертає увагу те, що АБ-1, а також транскрипційні фактори *c-jun* і *c-fos* мають критичні для їхньої здатності зв'язуватися з ДНК залишки цистеїну. Дисоціація комплексу NF-κB—інгбітор чутлива до окисно-відновного стану сульфгідрильних груп [127].

Таким чином, наведені дані свідчать про те, що на шляху передачі сигналу від ФНП до його мішеней існують біологічно активні сполуки, які взаємодіють і потенційно здатні взаємодіяти з окисом азоту. Припускаючи роль NO в регуляції передачі сигналу від ФНП, треба усвідомлювати, чи може забезпечуватися зворотність дії NO. Дослідження в цьому напрямку дають позитивну відповідь на поставлене питання. Вважається, що в клітині окис азоту знаходиться в певному співвідношенні з вільними тіолами, S-нітрозотіолами та іонами заліза. В залежності від цього співвідношення останні можуть сприяти як синтезу, так і деградації нітрозотіолів, зумовлюючи оберненість однієї з важливих реакцій NO в організмі [111]. У цілому ж з'ясування принципових можливостей взаємодії окису азоту з посередниками передачі сигнаду від ФНП дає підставу для проведення цілеспрямованих дослідів.

*М. Ю. Оболенская, А. А. Самойленко*

Регулирует ли окись азота процесс передачи сигнала от фактора некроза опухолей?

Резюме

*Обзор посвящен анализу возможной роли окиси азота в процессах восприятия и внутриклеточной передачи сигнала от фактора некроза опухолей (ФНО). Приводятся данные о совместном участии ФНО и окиси азота в различных физиологических и патофизиологических процессах. Рассматриваются альтернативные пути передачи сигнала от ФНО, приводящие к гибели клетки или к развитию компенсаторных реакций, обеспечивающих жизнеспособность клетки. Детально проанализированы особенности структуры белков — посредников в передаче сигнала от ФНО, определяющие возможность их взаимодействия с окисью азота. На основании проведенного анализа и имеющихся данных о взаимодействии некоторых посредников с окисью азота высказывается предположение об участии окиси азота в проявлении многообразных функций ФНО.*

*M. Yu. Obolenskaya, A. A. Samoilenko*

Does nitric oxide regulate the tumor necrosis factor signal transduction?

Summary

*This contribution is focused on the potential role of the nitric oxide in the perception and the intracellular transduction of tumor necrosis factor (TNF) signal. The data about concerted activities of TNF and nitric oxide in different physiological and pathophysiological processes are presented. Particular attention is paid to the structural peculiarities of TNF intercellular messengers that provide the possible interaction of nitric oxide with these messengers. On the basis of conducted analysis and the existing data about nitric oxide interaction with some intercellular messengers of TNF signal transduction it is suggested that nitric oxide plays a definite role in manifestations of multiple TNF functions.*

REFERENCES

1. *Goeddel D. V., Aggarrwal B. B., Gray P. W., Leung D. W., Nedwin G. E., Palladino M. A., Patton J. S., Pennica D., Shepard H. M., Sugarman B. J., Wong G. H. W.* Tumor

necrosis factors: gene structure and biological activities // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1986.—51.—P. 597—609.
2. *Beutler B., Cerami A.* Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator // Annu. Rev. Biochem.—1988.—57.—P. 505—518.
3. *Fiers W.* Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level // FEBS Lett.—1991.—285, N 2.—P. 199—212.
4. *Kroenke M., Schuetze S., Scheurich P., Pfizenmaier K.* TNF transduction and TNF-responsive genes // Tumor Necrosis Factors: Structure, Function, and Mechanism of Action // Eds B. B. Aggarwal, J. Vilcek—New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker Inc., 1991.—P. 189—216.
5. *Beck G., Habicht G. S.* Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense // Immunol. Today.—1991.—12, N 6.—P. 180—183.
6. *Radomski M. W., Martin J. F., Moncada S.* Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) // Phil. Trans. R. Soc. Lond.—1991.—334.—P. 129—133.
7. *Henry Y., Ducrocq C., Drapier J.-C., Servent D., Pellat C., Grissant A.* Nitric oxide: A biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells // Eur. Biophys. J.—1991.—20.—P. 1—15.
8. *Henry Y., Lepoivre M., Drapier J.-C., Ducrocq C., Boucher J.-L., Guissani A.* EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organells // FASEB J.—1993.—7.—P. 1124—1134.
9. *Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.* Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and Pharmacology // Pharmacol. Rev.—1991.—43, N 2.—P. 109—142.
10. *Kroncke K. D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V.* Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection — How, Why, When, and Where? // Nitric oxide: Biology and Chemistry.—1997.—1, N 2.—P. 107—120.
11. *Nathan C.* Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // FASEB J.—1992.—6.—P. 3051—3064.
12. *Stamler J. S., Simon D. I., Osborne J. A., Mullins M. E., Jaraki O., Michel T., Singel D. J., Loscalzo J.* S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1992.—89.—P. 444—448.
13. *Stamler J. S.* Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide // Cell.—1994.—78, N 6.—P. 931—936.
14. *Marletta M. A., Yoon P. S., Iyengar R., Leaf C. D., Wishnock J. S.* Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate // Biochemistry.—1988.—27, N 24.—P. 8706—8711.
15. *Marletta M. A.* Nitric Oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis // Cell.—1994.—78, N 6.—P. 927—930.
16. *Billiar T. R., Curran R. D., Stuehr D. J., West M. A., Bentz B. G., Simmons R. L.* An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro* // J. Exp. Med.—1989.—169.—P. 1467—1472.
17. *Stadler J., Trockfeld J., Schmalix W. A., Bril T., Siewert R., Grein H.* Inhibition of cytochrome P4501A by nitric oxide // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—91.—P. 3559—3563.
18. *Curran R. D., Billiar T. R., Stuehr D. J., Ochoa J. B., Harbrecht B. G., Flint S. G., Simmons R. L.* Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis // Ann. Surg.—1990.—21.—P. 462—469.
19. *Eigler A., Sinha B., Endres S.* Nitric oxide-releasing agents enhance cytokine-induced tumor necrosis factor synthesis in human mononuclear cells // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1993.—196, N 1.—P. 494—501.
20. *Old L. J.* Tumor necrosis factor (TNF) // Science.—1985.—230.—P. 630—632.
21. *Pohlman T. H., Harlan J. M.* Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis // Cell Immunol.—1989.—119, N 1.—P. 41—52.
22. *Beyaert R., Fiers W.* Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity // FEBS Lett.—1994.—3340.—P. 9—16.
23. *Muzio M., Chinnaiyan A. M., Kischkel F. C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J. D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P. H., Peter M. E., Dixit V. M.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex // Cell.—1996.—85, N 6.—P. 817—827.
24. *Hibbs J. B., Taintor R. R., Vavrin Z., Rachlin E. M.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1988.—157.—P. 87—94.
25. *Estrada C., Gomez C., Martin V. C., Moncada S., Gonzalez C.* Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-cytotoxicity in endothelial cells // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1992.—186, N 1.—P. 475—478.
26. *Larrick J. W., Wright S. C.* Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-$\alpha$ // FASEB J.—1990.—4.—P. 3215—3223.
27. *Camussi G., Albano E., Tetta C., Bussolino* The molecular action of tumor necrosis factor-$\alpha$ // Eur. J. Biochem.—1991.—202.—P. 3—14.
28. *Heller R. A., Kroenke M.* Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways // J. Cell. Biol.—1994.—126, N 1.—P. 55—59.
29. *Renington J. S., Merigan T. C.* Resistance to virus challenge in mice infected with protozoa or bacteria // Proc. Soc. Exp. Biol. Med.—1969.—131.—P. 1184—1188.
30. *Aono K., Isobe K., Nakashima I., Kondo S., Miyachi M., Nimura Y.* Kupffer cells cytotoxicity against hepatoma cells is related to nitric oxide // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1994.—201, N 3.—P. 1175—1181.
31. *Ionnidis I., deGroot H.* Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide // Biochem. J.—1993.—296, N 2.—P. 341—345.
32. *Decker K.* Basic mechanisms of the inflammatory response // 42 Colloquim Mosbach. Molecular Aspects of Inflammation.—Berlin; Heidelberg: Springer, 1991.—P. 1—23.
33. *Freudenberg M. A., Freudenberg N., Galanos C.* Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats // Brit. J. Exp. Pathol.—1982.—63.—P. 56—65.
34. *Decker K.* Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells) // Eur. J. Biochem.—1990.—192.—P. 245—261.
35. *Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T. M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegman K., Ohashi P. S., Kronke M., Mak T. K.* Mice deficient for the 55 kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection // Cell.—1993.—73.—P. 457—467.
36. *Wagner D. A., Young V. R., Tannebaum S. R.* Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}NH_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80.—P. 4518—4521.
37. *Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // Nature.—1987.—327.—P. 524—526.

38. *Mulligan M. S., Hevel J. M., Marletta M. A., Ward P. A.* Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88, N 14.—P. 6338—6342.
39. *Chander C. L., Moore A. R., Desa F. M., Howat D. W., Willoughby D. A.* Anti-inflammatory effects of endothelin-1 // J. Cardiovascul. Pharmacol.—1989.—5.—P. 218—219.
40. *Kilbourn R. G., Jubran A., Gross S. S., Grigffith O. W., Levi R., Adams J., Lodato R. F.* Reversal of endotoxin-mediated shock by $N^9$-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1990.—172, N 3.—P. 1132—1138.
41. *Veihelmann A., Brill Th., Blobner M., Scheller I., Mayer B., Proells M., Himpel S., Stadler J.* Inhibition of nitric oxide synthesis improves detoxication in inflammatory liver dysfunction *in vivo* // Amer. J. Physiol.—1997.—273.—G 530—536.
42. *Harbrecht B. G., Stadler J., Demetris A. J., Simmons R. L., Billiar T. R.* Nitric oxide and prostaglandins interact to prevent hepatic damage during murine endotoxemia // Amer. J. Physiol.—1994.—266.—G. 1004—1010.
43. *Billiar T. R., Curran R. D., Harbrecht B. G., Stuehr D. J., Demetris A. J., Simmons R. L.* Modulation of nitrogen oxide synthesis *in vivo*: $N^9$-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage // J. Leukocyte Biol.—1990.—48.—P. 565—569.
44. *Hutcheson I. R., Whittle B. J., Boughton-Smith N. K.* Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat // Brit. J. Pharmacol.—1990.—101.—P. 815—820.
45. *Malyshev I. Yu., Malugin A. V., Golubeva L.Yu., Zenina T. A., Manukhina E.V., Mikoyan V. D., Vanin A. F.* Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and cultured cells // FEBS Lett.—1996.—391.—P. 21—23.
46. *Kim Y.-M., deVera M. E., Wathins S. C., Billiar T. R.* Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression // J. Biol. Chem.—1997.—272, N 2.—P. 1402—1411.
47. *Vilcek J., Palombella V. J.* TNF as a Growth Factor // Tumor necrosis factor: Structure, Function and Mechanism of Action / Eds B. B. Aggarwal, J. Vilcek.—New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker Inc., 1991.—P. 269—286.
48. *Brenner D. A., O'Hara M., Angel P., Chojker M., Karin M.* Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor-alpha // Nature.—1989.—337.—P. 661—663.
49. *Lin J. X., Vilcek J.* Tumor necrosis factor and interleikin-1 cause a rapid and transient stimulation of *c-fos* and *c-myc* mRNA in human fibroblast // J. Biol. Chem.—1987.—262.—P. 11902—11911.
50. *Kalthoff H., Roeder H., Brockhaus M., Thiele H.-G., Schmiegel W.* Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 4.—P. 2762—2766.
51. *Tamura M., Arakaki N., Tsubouchi H., Takada H., Daikuhara Y.* Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 alpha and -1 beta and tumor necrosis factor-alpha by fibroblasts in culture // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 11.—P. 8140—8145.
52. *Obolenskaya M. Yu.* Cytokines and Liver Regeneration // EOS-J. Immunol. Immunopharmacol.—1997.—17, N 2.—P. 51—58.
53. *Obolenskaya M. Yu., Bernauer H., Tran-Thi T. A., Decker K.* Levels of RNA for TNF- and TNF receptors during prereplicative period of liver regeneration // Biopolimery i kletka.—1994.—10, N 2.—P. 152—156.
54. *Yamada Y., Kirilova I., Peschon J. J., Fausto N.* Inhibition of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94.—P. 1441—1446.
55. *Obolenskaya M. Yu., Vanin A. F., Morvintsev P. I., Muelsch A., Decker K.* EPR evidence of nitric oxide production by the regenerating rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1994.—202, N 1.—P. 571—576.
56. *Obolenskaya M. Yu., Schulze-Specking A., Plaumann B., Frenzer K., Freudenberg N., Decker K.* Nitric oxide production by cells isolated from regenerating rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1994.—204, N 3.—P. 1305—1311.
57. *Bauche F., Stephan J. P., Touzalin A. M., Jegou B. In vitro* regulation of an inducible-type NO synthase in the rat seminiferous tubule cells // Biol. Reprod.—1998.—58, N 2.—P. 431—438.
58. *Kuemmerle J. F.* Synergistic regulation of NOS II expression by IL-1 beta and TNF-alpha in cultured rat colonic smooth muscle cells // Amer. J. Physiol.—1998.—274.—G. 178—185.
59. *Saura M., Lopez S., Rodriguez Puyol M., Rodriguez Puyol D., Lamas S.* Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli // Kidney Int.—1995.—47, N 2.—P. 500—509.
60. *Worrall N. K., Chang K., LeJeune W. S., Misko T. P., Sullivan P. M., Ferguson T. B. Jr., Williamson J. R.* TNF-alpha causes reversible *in vivo* systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms // Amer. J. Physiol.—1997.—273.—H. 2565—2574.
61. *Uchida Y., Tsukahara F., Ohba K., Ogawa A., Irie K., Fujii E., Yoshimoto T., Yoshioka T., Muraki T.* Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes // Eur. J. Pharmacol.—1997.—335, N 2—3.—P. 235—243.
62. *Irie K., Tsukahara F., Fujii E., Uchida Y., Yoshioka T., He W. R., Shitashige M., Murota S., Muraki T.* Cationic amino acid transporter-2 mRNA induction by tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells // Eur. J. Pharmacol.—1997.—339, N 2—3.—P. 289—293.
63. *Van Dervort A. L., Yan L., Madara P. J., Cobb J. P., Wesley R. A., Corriveau C. C., Tropea M. M., Danner R. L.* Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils // J. Immunol.—1994.—152, N 8.—P. 4102—4109.
64. *Magrinat G., Mason S. N., Shami P. J., Weinberg J. B.* Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation and gene expression // Blood.—1992.—80, N 8.—P. 1880—1884.
65. *Eigler A., Moeller J., Endres S.* Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264.7 // J. Immunol.—1995.—154, N 8.—P. 4048—4054.
66. *Eck M. J., Sprang S. R.* The structure of tumor necrosis factor-$\alpha$ at 2.6 A resolution // J. Biol. Chem.—1989.—264, N 29.—P. 17595—17605.
67. *Banner D. W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.-N. J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W.* Crystal structure of the soluble human 55 kD TNF receptor—human TNFb complex: implications for TNF receptor activation // Cell.—1993.73.—P. 431—445.
68. *Bazan J. F.* Emerging families of cytokines and receptors // Curr. Biol.—1993.—3, N 9.—P. 603—606.
69. *Vandenabeele P., Declerq W., Beyaert R., Fiers W.* Two tumor necrosis factor receptors: structure and function // Trends Cell Biol.—1995.—5.—P. 392—399.

70. *Porteu F., Hieblot C.* Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils // J. Biol. Chem.—1994.—**269**, N 4.—P. 2834—2840.
71. *Mosselmans R., Hepburn A., Dumont J. E., Fiers W., Galand P.* Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells // J. Immunol.—1988.—**141**, N 9.—P. 3096—3100.
72. *D'Arcy A., Banner D. W., Janes W., Winkler F. K., Loetscher H., Schonfeld H.-J., Zulauf M., Gentz R., Lesslauer W.* Crystallization and preliminary crystallographic analysis of TNF-$\beta$ and a TNF-$\beta$-55 kDa TNF receptor complex // J. Mol. Biol.—1993.—**229**.—P. 555—557.
73. *Tartaglia L. A., Ayres T. M., Wong G. H. W., Goeddel D. V.* A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death // Cell.—1993.—**74**, N 5.—P. 845—853.
74. *Boldin M. P., Mett I. L., Varfolomeev E. E., Chumakov I., Shemer-Avni Y., Camonis J. H., Wallach D.* Self-association of the «death domains» of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 // J. Biol. Chem.—1995.—**270**.—P. 387—391.
75. *Song H. Y., Dunbar J. D., Donner D. B.* Aggregation of the intracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system // J. Biol. Chem.—1994.—**269**, N 36.—P. 22492—22495.
76. *Wiegmann K., Schuetze S., Machleidt Th., Witte D., Kroenke M.* Functional dichotomy of neutral anad acidic sphingomyelinase in tumor necrosis factor signaling // Cell.—1994.—**78**.—P. 1005—1015.
77. *Belka C., Wiegmann K., Adam D., Holland R., Neuloh M., Herrmann F., Kronke M., Brach M. A.* Tumor necrosis factor (TNF)-alpha activates c-raf-1 kinase via the p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelinase // EMBO J.—1995.—**14**, N 6.—P. 1156—1165.
78. *Adam D., Wiegmann J. K., Adam-Klages S., Ruff A., Kroenke M.* A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway // J. Biol. Chem.—1996.—**271**, N 14.—P. 14617—14622.
79. *Rothe M., Wong S. C., Henzel W. J., Goeddel D. V.* A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor // Cell.—1994.—**78**.—P. 681—692.
80. *Hsu S. J., Xiong J., Goeddel D. V.* The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation // Cell.—1995.—**81**, N 4.—P. 495—504.
81. *Baker S. J., Reddy E. P.* Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins // Oncogene.—1996.—**12**.—P. 1—9.
82. *Liu Z.-G., Hsu H., Goeddel D. V.* Dissection of TNF receptor I effective function: JNK activation is not linked to apoptosis while NFB activation prevents cell death // Cell.—1996.—**87**.—P. 565—576.
83. *Yuan Junying.* Transducung signals of life and death // Curr. Opinion Cell Biol.—1997.—**9**, N 2.—P. 247—251.
84. *Chinnaiyan A. M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V. M.* FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis // Cell.—1995.—**81**.—P. 505—512.
85. *Boldin M. B., Varfolomeev E. E., Pancer Z., Mett I. L., Camonis J. H., Wallach D.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain // J. Biol. Chem.—1995.—**270**.—P. 7795—7798.
86. *Claudio E., Segade F., Wrobel K., Ramos S., Bravo R., Lazo P. S.* Molecular mechanisms of TNF$\alpha$ cytotoxicity: activation of NF-$\kappa$B and nuclear translocation // Exp. Cell Res.—1996.—**224**.—P. 63—71.
87. *Adams-Klages S., Adam D., Wiegman K., Struve S., Kolanus W., Schneider-Mergener J., Kronke M.* FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase // Cell.—1996.—**86**, N 6.—P. 937—947.
88. *Hsu H., Shu H. B., Pan M. G., Goeddel D. V.* TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways // Cell.—1996.—**84**.—P. 299—308.
89. *Takeuchi M., Rothe M., Goeddel D. V.* Anatomy of TRAF2 // J. Biol. Chem.—1996.—**271**, N 33.—P. 19935—19942.
90. *Lovering R., Hanson I. M., Borden K. L., Martin S., O'Reilly N. J., Evan G. I., Rahman D., Pappin D. J., Trowsdale J., Freemont P. S.* Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—**90**, N 6.—P. 2112—2116.
91. *Miller J., McLachlan A. D., Klug A.* Repetative zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes // EMBO J.—1985.—**4**, N 6.—P. 1609—1614.
92. *Berg J. M.* Zinc fingers and other metal-binding domains // J. Biol. Chem.—1990.—**265**, N 2.—P. 6513—6516.
93. *Pellegrini S., Dusanter-Fourt I.* The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs) // Eur. J. Biochem.—1997.—**248**.—P. 615—633.
94. *Boldin M. B., Goncharov T. M., Goltsev Y. V., Wallach D.* Involvement of MACH, a novel MORT/FADD-interacting protease, in Fas/Apo-1- and TNF receptor-induced cell death // Cell.—1996.—**85**.—P. 803—815.
95. *Schwandner R., Wiegmann K., Bernardo K., Kreder D., Kroenke M.* TNF Receptor Death Domain-associated Proteins TRADD and FADD Signal Activation of Acid Sphingomyelinase // J. Biol. Chem.—1998.—**273**, N 10.—P. 5916—5922.
96. *Mathias S., Dressler K. A., Kolesnick R. N.* Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—**88**.—P. 1009—10013.
97. *Dobrowsky R. T., Kamibayashi C., Mumby M. C., Hamum Y. A.* Ceramide activate heterotrimeric protein phosphatse 2A // J. Biol. Chem.—1993.—**268**.—P. 15523—15530.
98. *Uren A. G., Pakusch M., Hawkins S. J., Puls K. L., Vaux D. L.* Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—**93**.—P. 4974—4978.
99. *Mosialos G., Birkenbach M., Yalamanchili R., Van Arsdale T., Ware C., Kieff E.* The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family // Cell.—1995.—**80**, N 3.—P. 389—399.
100. *Clim R. J., Fechheiner M., Miller L. K.* Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells // Science.—1991.—**254**.—P. 1388—1390.
101. *Shu H. B., Halpin D. R., Goeddel D. V.* Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis // Immunity.—1997.—**6**, N 6.—P. 751—763.
102. *Srinivasula S. M., Ahmad M., Ottilie S., Bullrich F., Banks S., Wang Y., Fernandes-Alnemri T., Croce C. M., Litwack G., Tomaselli K. J., Armstrong R. C., Alnemri E. S.* FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis // J. Biol. Chem.—1997.—**272**, N 30.—P. 18542—18545.
103. *Song H. Y., Rothe M., Goeddel D. V.* The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-$\kappa$B activation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—**93**.—P. 6721—6725.
104. *Cheng G., Baltimore D.* TANK, a co-inducer with TRAF2 of

TNF and CD 40L-mediated NF-κB activation // Genes and Develop.—1996.—10.—P. 963—973.

105. *Quaroni L., Reglinski J., Wolf R., Smith W. E.* Interaction of nitrogen monoxide with cytochrome P-450 monitored by surface-enhanced resonance Raman scattering // Biochim. and et biophys. acta.—1996.—1296, N 1.—P. 5—8.

106. *Estrada C., Gomez C., Martin-Nieto J., De Frutos T., Jimenez A., Villalobo A.* Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase // Science.—1997.—326.—P. 369—376.

107. *Mohr S., Stamler J. S., Brune B.* Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment // J. Biol. Chem.—1996.—271, N 8.—P. 4209—4214.

108. *Stamler J. S., Simon D. I., Jaraki O., Osborne J. A., Francis S., Mullins M., Singel D., Loscalzo J.* S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1992.—89, N 17.—P. 8087—8091.

109. *Lander H. M., Ogiste J. S., Pearce S. F. A., Levi R., Novogrodsky A.* Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on $p21^{ras}$ // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 13.—P. 7017—7020.

110. *Ignarro L. J.* Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.—1990.—30.—P. 535—560.

111. *Vanin A. F., Malenkova I. V., Serezhenkov V.* Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies // Nitric Oxide: Biology and Chemistry.—1997.—3, N 3.—P. 191—203.

112. *Gopalakrishna R., Chen Z. H., Gundimeda U.* Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 36.—P. 27180—27185.

113. *Lei S. Z., Pan Z. H., Aggarwal S. K., Chen H. S. V., Hartman J., Sucher N. J., Lipton S. A.* Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex // Neuron.—1992.—8, N 6.—P. 1087—1099.

114. *Caselli A., Camici G., Manao G., Moneti G., Pazzgli L., Capuggi G., Ramponi G.* Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase // J. Biol. Chem.—1994.—269, N 40.—P. 24878—24882.

115. *Huang R. P., Adamson E. D.* Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism // DNA Cell. Biol.—1993.—12, N 3.—P. 265—273.

116. *Kroncke K. D., Fehsel K., Schmidt T., Zenke F. T., Dasting I., Wesener J. R., Bettermann H., Breunig K. D., Kolb-Bachofen V.* Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9 // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1994.—200, N 2.—P. 1105—1110.

117. *Wink D. A., Laval J.* The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide *in vitro* and *in vivo* // Carcinogenesis.—1994.—15, N 10.—P. 2125—2129.

118. *Kroncke K. D., Kolb-Bachofen V.* Detection of nitric oxide interaction with zinc finger proteins // Meth. Enzymol.—1996.—269.—P. 279—284.

119. *Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., Harkins R. N.* Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 4.—P. 2345—2354.

120. *Kobayashi Y., Miyamoto D., Asada M., Obinata M., Osawa T.* Cloning and expression of human lymphotoxin mRNA derived from a human T cell hybridoma // J. Biochem. (Tokyo).—1986.—100, N 3.—P. 727—733.

121. *Dadlez M.* Disulfide bonds in protein folding studies: friends or foesi // Acta. biochim. pol.—1997.—44, N 3.—P. 433—452.

122. *Darnay D. G., Aggarwal B. B.* Inhibition of protein phosphatase causes phosphorylation of tyrosine-331 in the p60 TNF-receptor and inactivates the receptor-associated kinase // FEBS Lett.—1997.—410, N 2—3.—P. 361—367.

123. *Uchida K., Morita T., Sato T., Ogura T., Yamashita R., Noguchi S., Suzuki H., Nyunova H., Miwa M., Sugimura T.* Nucleotide sequence of a full-length cDNA for human fibroblast poly(ADP-ribose) polymerase // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1987.—148, N 2.—P. 617—622.

124. *Haendeler J., Weiland U., Zeiher A. M., Dimmeler S.* Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and Caspase-3 activity // Nitric Oxide: Biology and Chemistry.—1997.—1, N 4.—P. 282—293.

125. *Peunova N., Enikolopov G.* Amplification of calcium induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells // Nature.—1993.—364.—P. 450—453.

126. *Lander H. M., Sehajpal P. K., Novogrodsyk A.* Nitric oxide signalling: a possible role for G proteins // Immunology.—1993.—151.—P. 7182—7187.

127. *Schreck R., Bauerle P. A.* A role for oxygen radicals as second messengers // Trends Cell. Biol.—1991.—1.—P. 39—43.

УДК 547.963.3

Надійшла до редакції 09.06.98