

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ С МИКРОТРУБОЧКАМИ

©2018 г. Е. М. ЧУДИНОВА^{1,*}, Е. С. НАДЕЖДИНА^{1,2}

¹ Институт белка РАН, Пущино, Московская область

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва

I. Введение II. Ассоциация с микротрубочками рибосомных белков, факторов трансляции и РНК-связывающих белков. III. Микротрубочки как основа для сборки и разборки сложных РНП-содержащих комплексов. IV. Транспорт РНП по микротрубочкам. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Синтез белка (трансляция) – сложный процесс с множеством участников. Для осуществления трансляции формируются макромолекулярные комплексы, включающие в себя мРНК, тРНК, РНК-связывающие белки, рибосомы, а также белковые факторы, регулирующие трансляцию. Так, при инициации трансляции образуется последовательно 43S-преинициаторный комплекс, 48S и 80S-инициаторные комплексы, затем полисомы [1, 2]. Показано, что в клетках интенсивность трансляции намного выше, чем в бесклеточных системах. При разрушении клеточной мембраны сапонином скорость белкового синтеза в клетках не изменяется и в 40 раз превышает скорость *in vitro* в препарате полисом, приготовленном из тех же клеток [3]. Этот опыт демонстрирует, что для успешного белкового синтеза аппарат трансляции должен быть пространственно орга-

Принятые сокращения: НТО – нетранслируемые области мРНК; APC – Adenomatous Polyposis Coli; eEF – eukaryotic translation Elongation Factor; Egl – Egalitarian; eIF – eukaryotic translation Initiation Factor; Hu – antigens in HUman paraneoplastic neurologic disorders; JAKMIP1 – Janus Kinase and Microtubule Interacting Protein 1; KIF – Kinesin Family member; MAP1B LC1 – Microtubule-Associated Protein 1B Light Chain 1; мРНП – мессенджер РибоНуклеоПротеид; PABP – PolyA-Binding Protein; RpL – Ribosomal Protein from Large subunit; RpS – Ribosomal Protein from Small subunit; YB-1 – Y-Box-Binding Protein; ZBP1 – Zipcode-Binding Protein 1.

* Адрес для корреспонденции: chudiel@mail.ru

Работа выполнена в рамках госзадания, номер госрегистрации 01201362159.

низован. Логично предположить, что в пространственной и временной организации аппарата трансляции участвует цитоскелет, т.е. совокупность устойчивых к детергентам фибриллярных структур в цитоплазме. В состав цитоскелета входят актиновые и миозиновые филаменты, микротрубочки, промежуточные филаменты. Подобные структуры могут обеспечивать опору для пространственной организации и транспорт по цитоплазме. Действительно, при экспериментально вызванной разборке актинового цитоскелета интенсивность биосинтеза белка в клетках значительно снижается [4, 5]. Экспериментально вызванная разборка микротрубочек также снижает общую интенсивность синтеза белка примерно на 20% (собственные данные), при этом деполимеризация микротрубочек, по-видимому, ингибирует трансляцию только определенных видов мРНК, то есть действует избирательно [6].

Цитоскелет необходим и для пространственной дифференциации биосинтеза белка в клетках. Это явление особенно ярко выражено в ооцитах и ранних эмбрионах *Drosophila melanogaster* и *Xenopus laevis*, в нейронах, в почкующихся дрожжах [7–12]. Повышенную локализацию мРНК β -актина можно наблюдать в области фокального контакта в фибробластах [13]. Пространственная дифференциация биосинтеза белка важна в функциональном плане, например, для правильной сегментации эмбриона насекомых или для роста аксона и направленного перемещения по субстрату фибробластов.

Как же происходит взаимодействие аппарата трансляции с цитоскелетом? К компонентам аппарата трансляции в дальнейшем изложении мы относим рибосомы, рибосомные белки, факторы трансляции, а также разнообразные мРНК. Установлено, что по крайней мере некоторые компоненты аппарата трансляции могут транспортироваться по клетке по цитоскелетным структурам и/или используют цитоскелет для закрепления в определенных локусах цитоплазмы. Необходимость транспорта возникает, в частности, из-за того, что рибосомные белки синтезируются в цитоплазме, затем они должны быть доставлены в ядро, и затем готовые рибосомные субъединицы должны переместиться в цитоплазму клетки, в том числе, в ее отдаленные от ядра районы. Туда же должны переместиться, выйдя из ядра, и мРНК. Сравнительно короткие актиновые филаменты, образующие густую сеть в цитоплазме, удобны для закрепления полисом [14] или для регуляции факторов трансляции через их связывание [15–17]. Для транспорта в клетках на значительные расстояния (например, от ядра к периферии) обычно служат микротрубочки, которые имеют значительную длину.

Мы сосредоточимся на взаимодействии компонентов аппарата трансляции именно с микротрубочками. Микротрубочки – обязательный компонент цитоскелета, длинные, длиной до десятков микрон, трубчатые структуры диаметром 25 нм. Микротрубочки состоят из димерного белка тубулина, молекулы которого единообразно уложены в их стенке и могут обмениваться с пулом растворенного тубулина только на концах полимера. Единообразие укладки тубулина создает полярность микротрубочек, у которых различают плюс- и минус-концы с различной динамикой. Микротрубочки динамичны, в клетках они постоянно полимеризуются из тубулина и вновь разбираются. Их время полужизни измеряется минутами, реже десятками минут. Разборка микротрубочек сопровождается гидролизом ГТФ молекулами тубулина. Существует множество низкомолекулярных соединений, под действием которых микротрубочки теряют способность к сборке и разбираются, либо, напротив, становятся стабильными. С микротрубочками также связано много структурных белков, регулирующих их динамику. Изменение динамики микротрубочек играет значительную регуляторную роль в клетках [18], хотя механизм этого явления до конца не ясен. Важнейшая функция микротрубочек – транспортная. Различные клеточные компоненты движутся вдоль микротрубочек, присоединенные к белкам-моторам, активируемым микротрубочками и перемещающимся вдоль них. К микротрубочковым белкам-моторам относятся кинезины и динеины, также и некоторые миозины могут взаимодействовать с микротрубочками. Каждый из моторов может двигаться либо к плюс-концам (кинезины), либо к минус-концам (динеины и некоторые кинезины) микротрубочек. Отмечалось, что РНП-частицы транспортируются на большие расстояния, в частности, в отростки нейронов, именно по микротрубочкам [19], и экспериментальная разборка микротрубочек приводит к остановке транспорта РНП.

Транспорт РНП по микротрубочкам изучен недостаточно; во многих случаях молекулярный механизм ассоциации РНП и моторного белка или другого белка микротрубочки остается невыясненным. На фотографиях цитоскелета и рибосом, сделанных в криоэлектронном микроскопе, видно, что часть рибосом тесно прилежит к микротрубочкам, но ориентация этих рибосом по отношению к микротрубочкам различна [20]. Таким образом, остается неясным, какие именно из белков рибосом или ассоциированных с ними факторов участвуют в связывании с микротрубочками и насколько специфично это связывание. Для лучшего понимания взаимодействия аппарата трансляции и микротрубочек необходимо выяснить, какие именно белок–белковые или белок–РНКовые взаимодействия обуславливают это явление.

II. АССОЦИАЦИЯ С МИКРОТРУБОЧКАМИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ, ФАКТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

РИБОСОМНЫЕ БЕЛКИ И ФАКТОРЫ ТРАНСЛЯЦИИ В ПРЕПАРАТАХ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МИКРОТРУБОЧКАМИ

При проведении экспериментов по идентификации белков, связывающихся с микротрубочками, в клеточный или тканевой осветленный гомогенат добавляют экзогенные стабилизированные микротрубочки, после инкубации препарат наслаивают на 40–50% раствор глицерина и центрифугируют при 100000 g. Белки, связывающиеся с микротрубочками, оказываются вместе с ними в осадке (тест со-осаждения с микротрубочками). Иногда ограничиваются и эндогенными микротрубочками, полимеризующимися в гомогенате в присутствии вещества таксола. Классическим способом получения препарата микротрубочек является очистка микротрубочек методом циклической полимеризации – деполимеризации тубулина [21], основанном на том, что при понижении температуры микротрубочки разбираются, а при нагревании и добавлении 4М глицерина микротрубочки полимеризуются. Последовательными центрифугированиями с соблюдением температурного режима удается достигнуть высокой степени очистки тубулина. Белки, имеющие сродство к микротрубочкам, выдерживают несколько циклов очистки методом полимеризации–деполимеризации. Осадок микротрубочек анализируют методами 1D или 2D электрофореза, иммуноблотинга и масс-спектрометрии. Белков, способных связаться с микротрубочками при соосаждении, оказывается довольно много, обычно обнаруживают 200–600 индивидуальных белков. Интересно, что среди них всегда выявляются белки аппарата трансляции: рибосомные белки, факторы инициации и элонгации трансляции, белки, регулирующие трансляцию [22–29]. В гомогенатах растительных клеток 14–19% белков, связывающихся с микротрубочками, вовлечены в трансляцию [27, 28], в гомогенатах эмбрионов *Drosophila* – 8%, т.е. больше, чем белков любой другой функциональной группы [29]. При этом обычно остается не ясным, связываются ли белки аппарата трансляции непосредственно с тубулином или с другими белками, ассоциированными с микротрубочками, в том числе с моторными белками. Неясно также, какой именно из многочисленных белков сложных РНП-комплексов или мультисубъединичных факторов непосредственно связывается с микротрубочками, а какой – опосредованно в составе комплекса, поскольку в большинстве работ условия получения лизата таковы,

что допускают присутствие в нем рибосом или, по крайней мере, факторов трансляции как единого целого. Так, из лизата митотических клеток, осветленного при 19000 g, вместе с микротрубочками соосадились рибосомные белки RpL6, RpL13, RpL19, RpL22, RpL23, RpS27A, P0, P1, P2, а также некоторые из субъединиц факторов eEF1, eEF2, eIF1, eIF2, eIF3, eIF4 и eIF5 [26]. Нельзя исключить, что в осадок микротрубочек попадали целые рибосомы, возможно, вместе с факторами трансляции. Примерно тот же список белков (субъединицы факторов трансляции и некоторые белки рибосом) обнаруживали и в других экспериментах по соосаждению с микротрубочками, причем список рибосомных белков обычно отличается в разных работах. В составе изолированных митотических веретен, что, собственно, является вариантом соосаждения с микротрубочками, методом масс-спектрометрии обнаруживали не менее 20 (из примерно 80) рибосомных белков [30].

Инициаторный фактор eIF3 насчитывает до 11 субъединиц. Субъединица eIF3a (p170) в значительном количестве присутствует в препарате микротрубочек, выделенных из клеток мозгового слоя надпочечников [31], из мозга крупного рогатого скота [32], из растительных клеток [28]. Она соосаждается с микротрубочками из гомогената мозга крыс [22], из гомогената культивируемых макрофагов RAW264.7 [23], однако эта субъединица eIF3 не обнаружена среди белков, соосаждающихся с микротрубочками из ооцита *Xenopus*, находящегося в состоянии мейоза [25]. Из клеток, находящихся в митозе, eIF3a соосаждается с микротрубочками, если митотические клетки накапливали методом двойного тимидинового блока [24], но не в результате 12-часовой инкубации с нокодазолом с последующим встряхиванием [26]. Возможно, что связь eIF3a с микротрубочками зависит от функционального состояния клетки. Неясно, соосаждается ли eIF3 с микротрубочками как единый комплекс или соосаждаются только его субъединицы, которые могут находиться в клетках в свободном состоянии. Для установления субъединиц eIF3 комплекса, связывающихся с микротрубочками, нужны отдельные эксперименты с этими субъединицами, выделенными как индивидуальные белки. Таким образом, брутто-анализ белков, соосаждающихся с микротрубочками, является недостаточно надежным методом для изучения взаимодействия аппарата трансляции с микротрубочками.

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ
НА МИКРОТРУБОЧКАХ

Для выявления белков, взаимодействующих с микротрубочками, используются различные методические подходы. Сравнительно простым приемом является иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к изучаемому белку, причем обращают внимание на то, расположен ли данный белок вдоль микротрубочек. Как вариант, можно использовать эктопический синтез в клетках флуоресцентно меченного (слитого с GFP) изучаемого белка. При флуоресцентной микроскопии со-локализацию, т.е. концентрацию белка на микротрубочках выше цитоплазматического фона, можно обнаружить только при достаточно большой аффинности этого белка к микротрубочкам. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показана со-локализация с микротрубочками белка Rpg1 – ортолога субъединицы eIF3a у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [33]. В культивируемых клетках млекопитающих при иммунофлуоресцентной микроскопии eIF3a также обнаруживает слабую со-локализацию с микротрубочками [32].

Методом иммунофлуоресценции показана со-локализация с микротрубочками белка JAKMIP1, участвующего в регуляции трансляции некоторых мРНК в нейронах [34]. Опыты по экспрессии участков JAKMIP1 показали, что с микротрубочками взаимодействует N-концевой участок, тогда как C-концевой участок связывается с киназой JAK (Janus Kinase). JAKMIP1 – белок, участвующий в передаче сигнала от NMDA (N-methyl-D-aspartate) рецепторов, необходим для правильного развития нервных клеток и обеспечения синаптической пластичности. Мутации в *JAKMIP1* являются причиной аутизма и некоторых других неврологических заболеваний, что связано с участием JAKMIP1 в регуляции трансляции мРНК *Grin2a*, *Grin2b*, *Shank2*, кодирующих субъединицы рецептора NMDA, а также структурный белок постсинаптического уплотнения. JAKMIP1 обнаружен как в транспортирующихся РНП-гранулах, так и в транслирующихся полисомах нейронов [34].

Иммунофлуоресцентное окрашивание не дает возможности отличить белок, находящийся в составе мультисубъединичного комплекса, от белка в свободном виде. Так, рибосомные белки присутствуют в клетках как в свободном виде, так и в составе рибосом. При синтезе в клетках слитого с GFP Rpl22e его можно обнаружить как вдоль микротрубочек, так и в цитоплазме (рис. 1). При этом невозможно отличить пул свободного Rpl22e и пул этого белка, связанного с рибосомами.

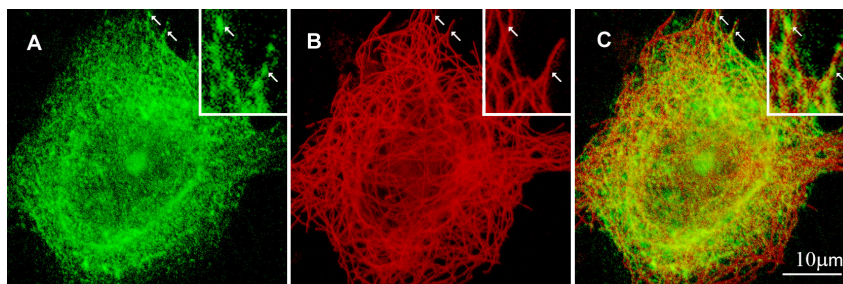


Рис. 1. Белок GFP-RpL22 частично со-локализуется с микротрубочками в культивируемой клетке Vero.

А – GFP-RpL22 (флуоресценция в зеленом канале).

В – иммуноокрашенные микротрубочки в той же клетке (флуоресценция в красном канале).

С – наложение изображений А и В.

Стрелками обозначены места отчетливой со-локализации. Фрагмент клетки показан в увеличенном размере.

Наибольшая концентрация микротрубочек наблюдается в митотическом веретене клеток. Если какие-либо белки имеют аффинность к микротрубочкам, и эта аффинность не пропадает в митозе, они также должны концентрироваться в веретене. В препаратах митотических веретен находят много рибосомных белков, и можно предположить, что с митотическими веретенами связаны сами рибосомы. Однако антитела к некоторым из рибосомных белков (RpL11, RpS6) не окрашивают митотические веретена [35], т.е. наиболее вероятна связь с веретеном все-таки индивидуальных рибосомных белков, а не самих рибосом. Интересно, что RpL11 найден в выделенном митотическом веретене методом масс-спектрометрии [28], хотя и не выявляется при иммунофлуоресцентном окрашивании. Методом иммунофлуоресценции в митотическом веретене обнаружен рибосомный белок RpS3. Показано, что при истощении пула RpS3 методом РНК-интерференции нарушается форма митотического веретена, происходит частичный блок метафазы, что говорит о том, что RpS3 может участвовать в регуляции динамики микротрубочек в митозе [35]. Один из наименьших (25 а.о.) и наиболее основных эукариотических белков – RpL41 – также обнаружен в центральном веретене в анафазе и телофазе. Истощение пула RpL41 при РНК-интерференции приводит к аномалиям центросом и центрального веретена, а также остаточного тельца в митозе [36].

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИКРОТРУБОЧКАМИ
ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ *IN VITRO*

Наиболее точным методом для определения молекулярных механизмов взаимодействия аппарата трансляции с микротрубочками является непосредственное исследование взаимодействия индивидуального белка с тубулином или с другими белками микротрубочек. Методом ко-иммунопреципитации показано связывание рибосомного белка RpL10 с тубулином [37]. Однако иммунопреципитацию проводили из клеточного лизата, осветленного только при 15000 g, т.е. содержавшего цельные рибосомы и их субъединицы, поэтому нельзя исключить, что с тубулином непосредственно связывался не RpL10, а другой белок рибосом, а RpL10 оставался с ним в комплексе. Доказательством взаимодействия белка с микротрубочками может быть только прямой эксперимент с очищенным белком и очищенным тубулином или белками микротрубочек. В немногих работах эксперименты выполнены этим методом. Рекомбинантный очищенный белок RpS3, несущий 6His-тэг, связывался с очищенным же тубулином, как показано методом ко-преципитации с использованием His-связывающей смолы [35]. Очищенные белки RpS3 и RpL41 соосаждались со стабилизированными таксолом микротрубочками [35, 36]. С микротрубочками, собранными из очищенного тубулина, соосаждался рекомбинантный очищенный белок RpL22 (Chudinova, Nadezhdina, в печати). Константа диссоциации для RpL22 и микротрубочек была определена как 1,3 μM , что не намного больше, чем константы диссоциации «классических» структурных белков микротрубочек. Компонент малой рибосомной субъединицы белок RpSA (RpS40), он же ламининовый рецептор LamR, в системе *in vitro* (вариант ELISA) связывался с ячейками, покрытыми тубулином. В тех же экспериментах сходный с RpSA бактериальный белок RpS2 аффинности к тубулину не проявлял [38], что служит аргументом в пользу специфичности взаимодействия. По нашим неопубликованным данным, рекомбинантный eIF3a (точнее, его N-концевой фрагмент) соосаждался с микротрубочками, собранными из очищенного тубулина, что может говорить о связи eIF3 с микротрубочками через эту субъединицу. Другие субъединицы eIF3 до сих пор не были проверены на их возможную аффинность к тубулину.

Достоверно показано и подробно исследовано взаимодействие с микротрубочками YB-1 (Y-Box-Binding Protein) – мультифункционального белка, участвующего в регуляции транскрипции и трансляции [39]. Установлено, что этот белок облегчает полимеризацию тубулина, как очищенного, так и содержащего ассоциированные белки.

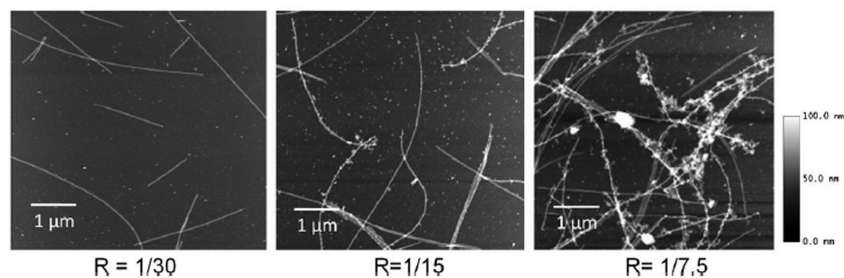


Рис. 2. Атомно-силовая микроскопия препаратов микротрубочек и мРНК люциферазы с белком YB-1 при различном молярном соотношении (R) YB-1 и РНК.

Видно, что взаимодействие происходит только при высоком содержании YB-1 относительно РНК. Из [41], с разрешения John Willey & Sons, Inc.

YB-1 соосаждается с микротрубочками и связывается с тубулином при аффинной хроматографии. Связь YB-1-сефарозы с тубулином нарушается только в 600 мМ NaCl, в то время как тубулин отмывается от казеин-сефарозы, взятой в качестве контроля, уже в 150 мМ NaCl. Это показывает, что ассоциация YB-1 с тубулином достаточно специфична. YB-1 продолжает связываться с тубулином и после удаления субитилизином С-концевого фрагмента тубулина, состоящего из остатков глутаминовой кислоты, т.е. при существенном изменении заряда молекул тубулина. Наблюдаемый методом атомной силовой микроскопии диаметр микротрубочек увеличивается, если они собраны в присутствии YB-1, вероятно, за счет того, что YB-1 покрывает их стенки снаружи, поскольку число тубулиновых протофиламентов в стенке микротрубочки не изменяется. Со свободным димерным тубулином YB-1 образует совместные агрегаты. В присутствии тубулина комплексы YB-1-мРНК меняют свою конформацию, что выражается в изменении их подвижности при нативном электрофорезе [40].

РНК-связывающие белки, как правило, положительно заряжены, что способствует их связыванию как с отрицательно заряженной РНК, так и с отрицательно заряженными микротрубочками. Возникает вопрос, существует ли конкуренция за связывание белков между РНК и микротрубочками? Исследование методом атомной силовой микроскопии выявило, что YB-1 при насыщающей концентрации может быть посредником в связывании мРНК с микротрубочками, т.е. связываться одновременно и с РНК, и с микротрубочкой. В присутствии YB-1 на микротрубочках образуются крупные агрегаты мРНК (рис. 2). По-видимому, таким же свойством обладает и белок PABP (Poly-A-Binding Protein) [41]. Это является аргументом в пользу участия

микротрубочек и тубулина в регуляции трансляции и ставит вопрос о возможности участия белков, связанных с трансляцией, в регуляции динамики микротрубочек. Данный вопрос пока практически не изучен.

КОМПОНЕНТЫ АППАРАТА ТРАНСЛЯЦИИ И ДИНАМИКА ЦИТОСКЕЛЕТА

Взаимодействие с мРНК показано для ассоциированного с микротрубочками структурного белка, онкосупрессора APC (Adenomatous polyposis coli) [42]. APC – белок, связывающийся с плюс-концом микротрубочек и ассоциирующийся также с краями клеток, в частности, участвующий в передаче сигнала по Wnt-пути. APC способен взаимодействовать с множеством белковых партнеров, кроме того, методом NITS-CLIP (сшивание белков с РНК под действием ультрафиолета) идентифицировано 260 мРНК, связывающихся с APC. Одна из этих мРНК кодирует β 2В-тубулин (Tubb2b) – изоформу β -тубулина, локализованную в области динамических микротрубочек в конусе роста аксона. При нарушении связи APC с мРНК *Tubb2b* динамичность микротрубочек ингибируется и наблюдаются нарушения миграции нейронов *in vivo*. Таким образом, заякоривание мРНК *Tubb2b* с помощью APC на конусе роста аксона регулирует динамичность микротрубочек [42]. APC важен также для заякоривания транскриптов на ведущем краю фибробластов [43] и для локальной трансляции мРНК *Lis1*, ко-фактора динеина, в аксонах в ответ на стимулирование фактором роста нейронов [44].

С микротрубочками связывается также фактор элонгации 1а ((EF-1а). При молярном соотношении EF-1а к тубулину 1:20 EF-1а стабилизирует микротрубочки: уменьшает частоту разборки микротрубочек и снижает скорость укорачивания микротрубочек в 2–3 раза как при их полимеризации из растительного тубулина, так и из тубулина из гомогената мозга крупного рогатого скота в системе *in vitro* [45]. Интересно, что при молярном соотношении EF-1а к тубулину 1:3 наблюдается фрагментация стабилизированных таксолом микротрубочек в аналогичных опытах *in vitro*, также наблюдалась фрагментация микротрубочек при микроинъекции EF-1а в фибробласты [46]. Сопоставляя две указанных выше работы, можно заключить что, концентрация свободного EF-1а регулирует динамичность микротрубочек. EF-1а также влияет на цитоскелет дрожжевых клеток. При сверхэкспрессии EF-1а в дрожжевых клетках отмечались повышение чувствительности к агентам, разрушающим цитоскелет (цитохалазину Д и тиабензадолу), и

изменения морфологии клеток, характерные для клеток с дефектным цитоскелетом [47]. Можно предположить, что через EF-1a осуществляется регуляция связи между интенсивностью трансляции и динамикой микротрубочкового цитоскелета: при интенсивной трансляции концентрация свободного EF-1a невелика и способствует стабилизации микротрубочек, при снижении темпов трансляции, например, при переходе клеток к митозу, концентрация свободного EF-1a повышается и это увеличивает динамическую нестабильность микротрубочек. К сожалению, данное явление не было изучено современными методами, и механизм действия EF1a на микротрубочки остается непонятным.

Имеются косвенные данные о связи с микротрубочками фактора инициации eIF4G. При сверхэкспрессии консервативного домена eIF4G в клетках у *Saccharomyces pombe* отмечалось разрушение как актинового, так и микротрубочкового цитоскелета [48]. Поскольку авторы использовали фрагмент eIF4G, трудно строить предположения об истинной значимости полноразмерного eIF4G в управлении динамикой цитоскелета.

Методом дрожжевой двугибридной системы показано взаимодействие белка Р-выступа рибосомы Р0 с кинезиноподобным белком KIF4, картирован участок взаимодействия в KIF4, которым оказался эзрин-моззин-радиксин-подобный домен. Показано, что подавление синтеза KIF4 методом РНК-интерференции или удаление его эзрин-моззин-радиксин-подобного домена ингибируют перемещение рибосом в аксоны нейронов [49].

Существует категория белков, для которых не показана непосредственная связь с микротрубочками, но при деполимеризации микротрубочек нарушается их перемещение из ядра в цитоплазму [50, 51]. К таким белкам относится РНК-связывающий белок HuR, участвующий в регуляции трансляции. Белки семейства Hu (antigens in human paraneoplastic neurologic disorders) родственны РНК-связывающим белкам *Drosophila* ELAV (embryonic lethal abnormal visual system); они ответственны за посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. Нейроспецифичный белок HuD усиливает кэп-зависимую трансляцию, взаимодействуя с eIF4a и поли(А)-участком РНК [52]. С помощью дрожжевой двугибридной системы показано, что HuD взаимодействует с легкой цепью ассоциированного с микротрубочками белка 1B (MAP1B LC1). Ассоциация HuD с микротрубочками через MAP1B LC1 также подтверждена методом pull-down и иммунофлуоресцентным микроскопическим исследованием. С MAP1B LC1 могут связываться и другие нейроспецифичные белки семейства Hu:

HuB, HuC, тогда как повсеместно экспрессирующийся HuR с MAP1B LC1 не связывается [53]. Несмотря на то, что непосредственной связи между HuR и микротрубочками не показано, при разрушении микротрубочкового цитоскелета веществом МРТ0В098 нарушается ядерно-цитоплазматический транспорт HuR, и HuR накапливается в ядре [54]. Механизм этого явления остается непонятным: он может быть связан как с нарушением транспорта белка вдоль микротрубочек, так и со стрессовым ответом клеток.

III. МИКРОТРУБОЧКИ КАК ОСНОВА ДЛЯ СБОРКИ И РАЗБОРКИ РНП-КОМПЛЕКСОВ

Микротрубочки могут служить каркасом для объединения элементов аппарата трансляции в гранулы микронного размера. Как уже указывалось выше, в присутствии белков YB-1 и/или PABP мРНК образует на микротрубочках достаточно крупные гранулы, чему способствует, вероятно, поливалентность YB-1 и PABP, которые могут связывать молекулы мРНК друг с другом и с микротрубочками [41].

Возможная роль микротрубочек как структурной основы для разборки белкового комплекса предложена в работе Chierchia с соавторами [37]. Авторы полагают, что микротрубочки способствуют отсоединению антиассоциативного eIF6 от 60S субъединицы рибосомы. Для трансляции некоторых мРНК необходима ассоциация с микротрубочками. Зависимая от микротрубочек трансляция показана, в частности, для белка hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). При деполимеризации микротрубочек нокодазолом или стабилизации таксолом трансляция HIF-1 прекращается, мРНК депонируется в Р-тельца и деградирует [6, 55]. Р-тельца – плотные скопления РНП в цитоплазме, в которых происходит декэпирование и 5'-3' деградация мРНК. При деполимеризации микротрубочек количество Р-телец увеличивается [55], возможно, это происходит потому, что связанные с микротрубочками полисомы прекращают трансляцию, и мРНК из них переходит в Р-тельца.

Известно, что при ингибировании инициации трансляции (например, при окислительном стрессе), преинициаторные комплексы, включающие в себя мРНК с ассоциированными белками, малую субъединицу рибосомы и некоторые факторы инициации, собираются в плотные гранулы, размеров до нескольких микрон, называемых стрессовыми гранулами (рис. 3). Стрессовые гранулы отличны от Р-телец. В стрессовых гранулах элементы аппарата трансляции сохраняются в «замороженном» статическом состоянии, но мРНП

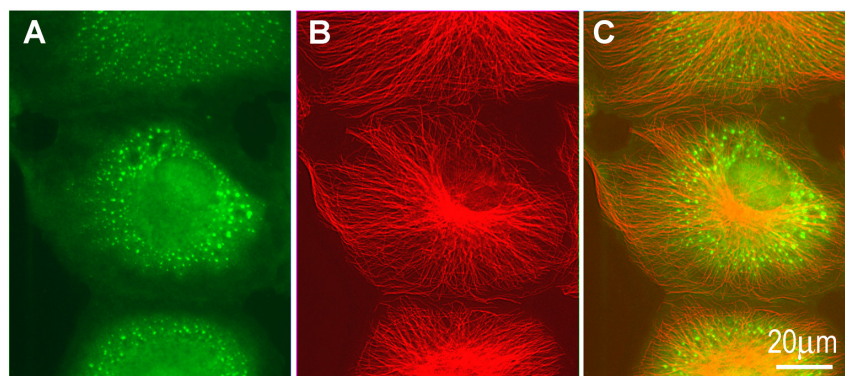


Рис. 3. Стрессовые гранулы в культивируемой клетке CV-1, обработанной арсенидом натрия.

А – белок eIF3a (один из маркеров стрессовых гранул) (флуоресценция в зеленом канале).

В – микротрубочки (флуоресценция в красном канале).

С – наложение изображений А и В.

постепенно выходят из них, вступая на путь деградации или на путь возобновления белкового синтеза. При этом происходит сортировка мРНК: мРНК, кодирующая полезные для клетки при стрессе и при выходе из него белки сохраняется, остальная деградирует. После снятия стрессорных воздействий стрессовые гранулы рассасываются, белковый синтез возобновляется с участием сохранившихся мРНК [56–58].

После экспериментальной деполимеризации микротрубочек стрессовые гранулы формируются существенно медленнее, и они более мелкого размера [59–64]. При умеренной силе стрессового воздействия разрушение микротрубочек может полностью затормозить формирование стрессовых гранул [59]. Без микротрубочек также тормозится дезинтеграция стрессовых гранул после снятия стресса [64]. Интересно, что и стабилизация микротрубочек действием таксола также ингибирует формирование стрессовых гранул [63]. Авторы данной работы полагают, что микротрубочки способны толкать компоненты стрессовых гранул своим растущим плюс-концом или тянуть их за собой при разборке, что способствует ассоциации компонентов стрессовых гранул друг с другом.

Конкретная роль микротрубочек в динамике стрессовых гранул остается непонятной. Из многих экспериментов ясно, что простая диффузия по цитоплазме компонентов стрессовых гранул не в состоянии обеспечить быструю сборку столь крупных частиц, поскольку

ей мешает высокая вязкость цитоплазмы, актиновые филаменты, мембраны и т.п. Собственно, ситуация простой диффузии РНП реализуется в клетках с разобранными микротрубочками [62]. Для сборки стрессовых гранул перемещение их компонентов по цитоплазме должно быть облегчено, т.е. увеличена скорость или уменьшены необходимые расстояния перемещения. Эту задачу должны выполнять микротрубочки. Можно высказать несколько предположений о конкретной роли микротрубочек в сборке стрессовых гранул: 1) компоненты стрессовых гранул передвигаются по микротрубочкам по механизму активного транспорта с помощью белков-моторов; 2) компоненты стрессовых гранул передвигаются по микротрубочкам по механизму одномерной диффузии; 3) компоненты стрессовых гранул прикреплены к микротрубочкам, а те движутся друг относительно друга с помощью белков-моторов; 4) претерпевающие динамическую нестабильность микротрубочки проталкивают и протаскивают компоненты стрессовых гранул по цитоплазме, как это предполагается в работе Chernov с соавторами [63]. Пока нет никаких доказательств в пользу последнего предположения, т.е. нет экспериментальных данных, показывающих специфическое взаимодействие динамических концов микротрубочек и разнообразных РНП.

Анализ перемещений в клетках самих стрессовых гранул показал, что они движутся диффузно, т.е. хаотично и с низкой скоростью (до 0,15 микрон/с), но иногда могут совершать быстрые (более 0,5 микрон/с) пробеги вдоль микротрубочек, которые можно отнести к активному транспорту [64]. Впрочем, подобные пробеги достаточно редки. Данные об участии моторных белков – кинезина или динеина – в сборке стрессовых гранул противоречивы. Некоторые авторы сообщают, что ингибирование динеина (ретроградного движения) приводит к нарушению сборки стрессовых гранул [65, 66], а ингибирование кинезина-1 (антероградного движения) – к нарушению их разборки [66]. Другие же авторы не обнаружили никакого влияния ингибирования динеина на сборку стрессовых гранул [61, 63]. При понижении pH культуральной среды стрессовые гранулы в клетках HeLa под воздействием арсенита натрия не образуются [67]; отсутствие стрессовых гранул при ацидозе можно объяснить ингибированием белков-моторов. Мы полагаем, что вопрос об участии моторных белков в сборке стрессовых гранул нуждается в дальнейшем исследовании с конкретизацией используемых объектов и методов ингибирования моторных белков.

По-видимому, существенную роль в сборке стрессовых гранул или других крупных РНП-частиц может играть одномерная диффузия их

компонентов по микротрубочкам. Ассоциация с микротрубочками значительно увеличивает вероятность взаимодействия компонентов стрессовых гранул друг с другом из-за локального увеличения их концентрации, и одномерная диффузия работает в том же направлении. При этом диффузия, т.е. разнонаправленное АТФ-независимое движение, может оказаться более предпочтительной, чем направленное движение с помощью белков-моторов, которое может привести скорее к сепарации разных компонентов стрессовых гранул. Передвижение молекул вдоль микротрубочек посредством одномерной диффузии, по-видимому, осуществляется за счет взаимодействия отрицательно заряженных С-концевых участков тубулина и положительно заряженных участков скользящих белков [68]. При удалении отрицательно заряженного С-концевого участка тубулина (обработка субтилизином), воздействии высокой ионной силы или изменении рН раствора, одномерная диффузия вдоль микротрубочек упраздняется [69, 70]. К настоящему времени одномерная диффузия вдоль микротрубочек экспериментально показана для многих белков, ассоциированных с микротрубочками [68–72]. К сожалению, пока не было найдено РНК-связывающих белков, обладающих способностью к выраженной диффузии по микротрубочке. Так, рибосомный белок RpL22 может хаотично передвигаться по микротрубочке только на очень небольшие расстояния (Chudinova, Nadezhdina, в печати) по сравнению с такими белками как субъединица динактоинового комплекса p150^{Glued}, обладающими способностью к интенсивной (с большой амплитудой перемещений) одномерной диффузии (рис. 4).

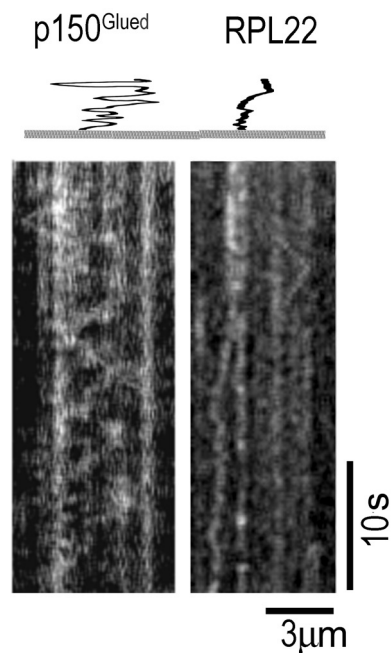


Рис. 4. Диффузия белков GFP-p150^{Glued} и GFP-RpL22 по микротрубочке *in vitro*.

Показаны кимографы, снятые в TIRF-микроскопе, и прорисовки треков в измененном масштабе времени.

IV. ТРАНСПОРТ РНП ПО МИКРОТРУБОЧКАМ

ПЕРЕМЕЩЕНИЕ ПОЛИСОМ И ТРАНСПОРТНЫХ ГРАНУЛ

В клетках существуют общие и частные (связанные с синтезом определенного белка) механизмы транспорта полисом. В любом случае рибосомы должны быть перемещены от ядра к периферии клетки, в том числе в отростки нейронов и т.п. отдаленные районы клеток. Полисомы могут быть связаны с микротрубочками через кинезин Eg5 (KIF11). Ингибирование Eg5 монастролом или снижение синтеза Eg5 с помощью РНК-интерференции понижали общий уровень трансляции на 40% [73]. При анализе полисомного профиля наблюдали связь Eg5 именно с полисомами. Остается неясным вопрос, связан ли Eg5 с рибосомами непосредственно или через дополнительный белок-посредник. Авторы исследовали несколько клеточных линий, получив одинаковые результаты, что позволяет предположить, что ассоциация полисом с микротрубочками через Eg5 широко представлена в клетках млекопитающих и используется для транспорта полисом от околоядерной области к периферии клеток (рис. 5).

Для базидиомицетов продемонстрирован другой способ перемещения полисом. Как убедительно показано в работе Higuchi с соавторами [74], рибосомы могут транспортироваться вдоль микротрубочек в составе ранних эндосом. В протяженных клетках гриба *Ustilago maydis* рибосомы концентрируются на апикальном конце гифа. Такое распределение достигается за счет транспорта комплекса рибосом с ранней эндосомой с участием моторных белков динеина и кинезина. Для передвижения рибосом необходим РНК-связывающий белок Rrm4 (RNA Recognition Motif 4), с которым в клетках грибов связывается более 50% мРНК. Не ясно, ассоциируется ли Rrm4 с белками моторами непосредственно или через элементы ранней эндосомы, но делеция белка Rrm4, как и мутации кинезина-3 (KIF1) и динеина, вызывает нарушение транспорта и скопление рибосом в области ядра. При транспорте обычно происходит объединение нескольких мРНК, вероятно, в составе полисом, в одну транспортируемую гранулу. Важно отметить, что транспортируются только активно транслирующие полисомы, при ингибировании белкового синтеза и диссоциации полисом транспорт рибосом останавливается.

Graber с соавторами [75] полагают, что в нейронах мРНК транспортируется в аксоны и дендриты в составе трансляционно репрессированных полисом. По мнению авторов стадия инициации и первый цикл элонгации трансляции происходит в соме нейрона, далее неак-

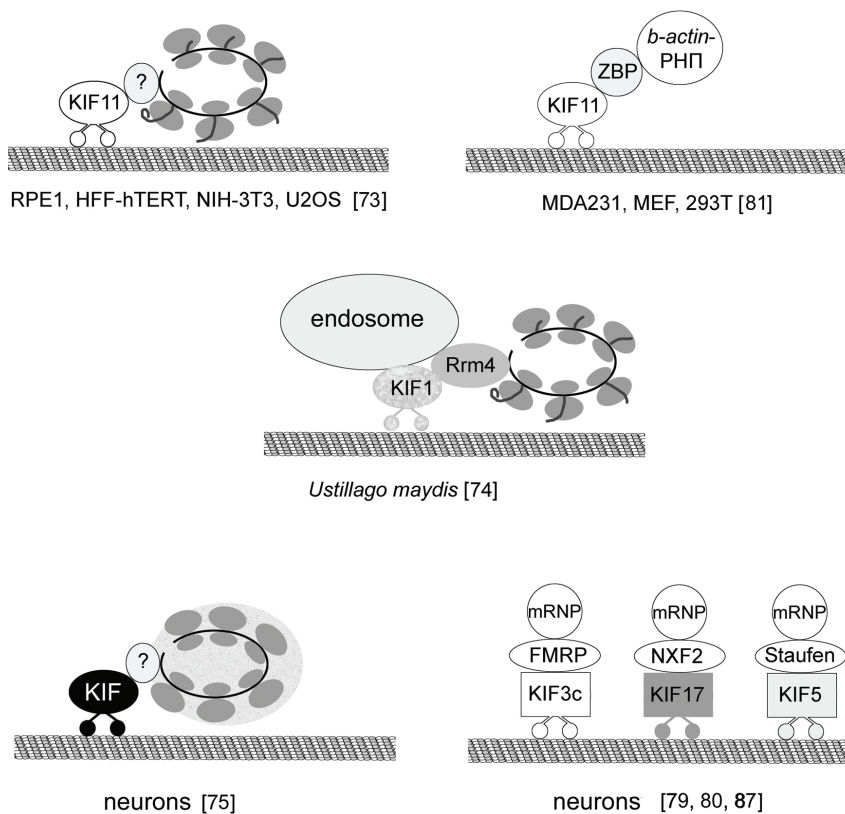


Рис. 5. Схема взаимодействия полирибосом и различных мРНП с кинезинами.

тивные полисомы транспортируются в окончания нейритов, где под влиянием внешнего стимула начинается быстрая реактивация трансляции. Эти неактивные полисомы образуют так называемые транспортные гранулы, отличающиеся по составу и от стрессовых гранул, и от Р-телец [19]. Анализ протеома выделенных транспортных гранул и высокоразрешающая электронная микроскопия также свидетельствуют о возможности перемещения рибосом в составе РНП-гранул нейронов [75, 76].

ИЗБИРАТЕЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ ОТДЕЛЬНЫХ мРНК

Как уже отмечалось выше, мРНК и другие компоненты аппарата трансляции могут транспортироваться по клеткам [9–13, 19], причем существует избирательность транспорта в отношении различных мРНК. В статье Pichon с соавторами [77] представлен элегантный метод визуализации трансляции в живой клетке. В работе использовали клетки, стабильно экспрессирующие слитый с GFP фрагмент антитела, узнающий пептид из дрожжевого белка Gcp4, а также белок интереса, несущий на N-конце 56 tandemных повторов пептида Gcp4. GFP-антитела связываются с этими повторами, что позволяет выявить вновь синтезированный белок в виде яркой зеленой точки в клетке. Для идентификации мРНК к 3'-концу мРНК интереса присоединена MS2-шпилька, которая в свою очередь узнается MS2-связывающим белком (MCP), слитым с красным флуоресцентным белком RFPt. Эта мРНК выявляется в виде красной точки. Такая система позволила наблюдать трансляцию в живых клетках на уровне единичной молекулы. Показано, что полисомы, транслирующие РНК-полимеразу II (POLR2A) или ядерный белок Ki-67, перемещались по цитоплазме диффузно, тогда как полисомы, транслирующие тяжелую цепь динеина, обнаруживали прямолинейное зависимое от микротрубочек движение со средней скоростью 1 микрон/с. Это позволяет предположить, что в перемещении некоторой части полисом по цитоплазме задействованы микротрубочковые моторные белки, в то время как другие полисомы не связаны с моторными белками. Логично предположить, что микротрубочковые моторные белки специфично связываются с определенными мРНК.

Для связывания с моторными белками необходимы белки-посредники, узнающие специфические последовательности в мРНК. Такой белок-посредник должен также узнавать определенный моторный белок. В настоящее время выявлено около 45 генов, кодирующих белки класса кинезинов, из-за альтернативного сплайсинга изоформ кинезинов еще больше. Согласно Hirokawa и Tanaka [78], насчитывается 15 семейств кинезинов. Адаптерные молекулы между мРНК и кинезинами изучены слабо и выявлены только для некоторых типов кинезинов (рис. 5). Нейроспецифичный кинезин KIF3C связывается с мРНК через белок FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) [79]. Кинезин KIF17 взаимодействует с РНК-гранулами через NXF2 (Nuclear RNA export Factor) – фактор, осуществляющий экспорт мРНК из ядра, который также играет дополнительную роль адаптера для транспорта РНК-гранул по цитоплазме [80]. Кинезин KIF11 (Eg5) связывается с β -актиновой мРНК через белок ZBP1 (Zipcode-Binding

protein 1) [81]. Белок ZBP1 узнает так называемый зипкод (zipcode) – 54 нуклеотида на 3'-НТО мРНК β-актина [82]. ZBP1 является одним из белков, ингибирующих преждевременную трансляцию. В клетках нейробластомы NG108-15 мРНК β-актина связывается с ZBP1 котранскрипционно и транспортируется кинезином к краю клеток, где после фосфорилирования киназой Src по Tyr396 ZBP1 отсоединяется от мРНК и начинается синтез β-актина [83]. Зипкод обнаружен еще в нескольких мРНК, более того, помимо зипкода, выявлены другие сигнальные последовательности в 5'- или 3'-НТО некоторых мРНК, предположительно регулирующих их транспорт и локус трансляции [84, 85]. Взаимодействие этих регуляторных элементов с цитоскелетом не изучено.

Для кинезина KIF5 (кинезин-1) выявлена консервативная последовательность из 59 аминокислот в «хвостовом» домене тяжелой цепи, необходимая и достаточная для связывания транспортных РНП-гранул. Методом pulldown определены 42 белка, входящие в состав РНП-гранул из гомогената мозга мыши и связывающиеся с этой последовательностью [86]. Наиболее вероятным кандидатом на роль линкерной молекулы между мРНК и кинезинами семейства KIF5 (кинезин-1) является белок Staufen1 [87].

Много работ по выявлению механизмов транспорта РНК выполнено на ооцитах дрозофилы. Асимметричное расположение некоторых мРНК в ооците необходимо для последующей правильной сегментации тела развивающейся личинки. Ооциты дрозофилы расположены в яйцевой камере и окружены 15 клетками-кормилками. Клетки-кормилки и ооциты объединены в общую систему через кольцевые каналы, причем на всю группу клеток приходится один центр организации микротрубочек, расположенный в ооците, от которого микротрубочки распространяются по всем клеткам. Микротрубочки, таким образом, имеют минус-концы, расположенные в ооците, и плюс-концы, расположенные в клетках-кормилках. В клетках-кормилках синтезируется мРНК, которая через систему каналов транспортируется в ооцит.

Имея в своем распоряжении коллекцию трансгенных дрозофил, Gaspar с соавторами [88] показали, что большинство молекул мРНК *oskar* связывается с кинезином-1 сразу после экспорта мРНК в цитоплазму в околядерной зоне клеток-кормилок. Однако в клетках-кормилках кинезин-1 не активен, и РНП передвигается в ооцит, т.е. к минус-концу микротрубочек, с помощью динеина [88, 89]. В среднем оогенезе (mid-oogenesis) происходит активация кинезина, мРНК *oskar* перемещается на постериальный конец ооцита, где закоривается

на актиновых филаментах. Вероятно, немаловажное значение в адресной доставке мРНК в ооцитах дрозофилы играет такое явление как перемешивание цитоплазмы (streaming), осуществляющееся благодаря скольжению микротрубочек относительно друг друга с помощью кинезина-I (KIF5a) [90]. Эффективное перемешивание цитоплазмы возможно из-за присутствия в ооцитах дрозофилы двух популяций микротрубочек: неподвижных, закрепленных на кортексе и активно перемещающихся микротрубочек. В ооцитах мух, содержащих мутантный кинезин I с редуцированной способностью к скольжению микротрубочек относительно друг друга (связывание с грузом при этом не нарушалось), зарегистрировано более диффузное расположение *oskar* [91]. Таким образом, в правильной локализации мРНК *oskar* задействованы два процесса: активный транспорт по микротрубочкам и перемешивание цитоплазмы ооцита посредством скольжения микротрубочек относительно друг друга [91].

Как недавно показано двумя независимыми группами, адапторной молекулой между кинезином-1 и мРНК *oskar* является РНК-связывающий атипический тропомиозин (Tropomyosin1-I/C) [88, 92]. При ко-иммунопреципитации с тропомиозином взаимодействуют как тяжелая цепь кинезина-1, так и белок Staufen1, причем происходит ли это взаимодействие напрямую или через молекулу кинезина, не совсем понятно. Опыты по кросс-сшивке РНК-белок под влиянием ультрафиолета (254 нм) показали, что мРНК *oskar* связывается непосредственно с тропомиозином [86].

Присоединение мРНК к динеину осуществляется через белки Egalitarian (Egl) и Bicaudal-D [93]. Bicaudal-D – кофактор динеина, участвующий в присоединении нескольких разновидностей грузов (cargo) [94]. N-концевая часть и середина Bicaudal-D ответственна за связывание с динеин-динактиновым комплексом, тогда как C-концевая связывается с различными линкерными молекулами, в том числе с Egl. В системе *in vitro* было показано, что Egl связывается с мРНК непосредственно. В работе использовали присоединенные к стрептавидиновому матриксу аптамеры РНК, слитые с РНК, как содержащие сигналы апикальной локализации мРНК (*TLS*, *ILS*, *GLS*), так и не содержащие сигналы локализации (*TLS^{as}*, *TLS^{Abub}*, *TLS^{U6C}*, *ILS^{as}*). Синтезированный *in vitro* Egl связывался со всеми видами РНК, при этом с РНК, содержащими сигнал локализации, эффективность связывания была выше более, чем в 2 раза [95]. Egl не содержит классических РНК-связывающих мотивов, за связывание с РНК отвечает протяженный участок 1–814 а.о. [93]. По-видимому, в образовании комплекса РНК–Egl также задействованы легкие цепи динеина [96].

Динеин необходим для антериальной локализации в ооците мРНК *bicoid*, также необходимой для правильной сегментации тела личинки. В связывании динеина с *bicoid* принимает участие белковый комплекс ESCRT-II, обычной функцией которого является сортировка белков эндосом во внутриклеточные везикулы. Один из компонентов ESCRT-II, белок VPS36, узнает специфическую последовательность в 3'-НТО мРНК *bicoid*, связывает динеин и перемещается вместе с мРНК к антериальной части ооцита, где рекрутирует белок Staufen [97]. Адапторные молекулы между РНК и динеином в других типах клеток практически не изучены.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аппарат трансляции несомненно взаимодействует с микротрубочками, элементом цитоскелета, образующем транспортные пути клетки и опору для мультимолекулярных комплексов. Функциональная нагрузка такой ассоциации может заключаться как в обеспечении транспорта белковых или РНП-молекул, так и в формировании или дезинтеграции белковых, или рибонуклеопротеидных комплексов.

Достоверно показано, что непосредственно с тубулиновыми микротрубочками связываются свободные рибосомные белки RpS3, RpSA (RpS40, LamR), RpL11, RpL22, RpL41, однако пока остается неизвестным, взаимодействуют ли эти белки с микротрубочками, когда находятся в составе рибосом. С микротрубочками связываются также транскрипционные факторы eEF-1 α и eIF3, причем последний, вероятно, через субъединицу eIF3a. С микротрубочками ассоциируется мажорный мРНК-связывающий белок YB-1, который может опосредовать неспецифическое взаимодействие микротрубочек и мРНК. Ассоциированный с микротрубочками структурный белок APC взаимодействует с большим количеством разных мРНК, а белок MAP1B LC1 взаимодействует с РНК-связывающими белками семейства Nu. Все указанные взаимодействия приводят к образованию статичных комплексов, не считая возможности одномерной диффузии белков или РНП по микротрубочкам.

Значительная часть мРНП и/или полисом взаимодействует с микротрубочками через моторные белки, и смыслом такого взаимодействия является транспорт мРНП и полисом по цитоплазме, чаще всего с последующей локальной трансляцией. Локальная трансляция избранных мРНК нередко необходима для осуществления клеточных функций, например, для сегментации тела личинок насекомых или для направленного перемещения фибробластов млекопитающих по

субстрату. Для функционирования клеток с длинными отростками, в частности, нейронов, нужен активный транспорт всех компонентов аппарата трансляции в отдаленные части цитоплазмы. В транспорте компонентов аппарата трансляции участвуют многие моторные белки, как кинезины, так и динеины. Кинезин KIF4 связывается с рибосомным белком P0, кинезин KIF11 (Eg5) – с полисомами (мишень связывания не уточнена). У грибов кинезин KIF1 связывается с полисомами чрез белок Rrm4. В нейронах кинезин KIF3C связывается с белком РНП FMRP, а кинезин KIF17 – с белком NXF2. Еще одним белком-посредником является ZBP, ассоциирующийся как с определенной последовательностью (зипкодом) на 3'-конце мРНК, так и с кинезином KIF11. «Обычный» кинезин-1 (KIF5) также участвует в транспорте мРНК в ооцитах *Drosophila*, связываясь с белками Staufen 1 и с атипическим тропомиозином, в свою очередь узнающим мРНК *oscar*. Динеиновый комплекс, состоящий из многих полипептидов, через свой полипептид Bicaudal взаимодействует с РНК-связывающим белком Egalitarian (Egl) и компонентом комплекса ESCRT-II белком VPS36, что также необходимо для правильной локализации некоторых мРНК в ооците.

Таким образом, взаимодействие аппарата трансляции с микротрубочками включает как неспецифическое, повсеместно встречающееся связывание некоторых белков рибосом, трансляционных факторов и т.п., с микротрубочками, так и избирательное взаимодействие некоторых мРНК с разнообразными моторными белками микротрубочек через белки-посредники, узнающие определенные последовательности в мРНК (рис. 5). Избирательность в транспортировке определенных видов мРНК свидетельствует об участии микротрубочкового цитоскелета в регуляции экспрессии генов посредством обеспечения локальной трансляции мРНК. «Неспецифическое» взаимодействие может способствовать этой функции или служить своим целям, регулируя трансляцию в клетке на общем уровне, а также участвуя в регуляции динамики микротрубочек.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation, *Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 113–127.
2. Афонина Ж.А., Широков В.А. (2018) Трехмерная организация полирибосом – современный подход, *Успехи биологической химии*, **58**.
3. Negrutskii, B.S., Stapulionis, R., Deutscher, M.P. (1994) Supramolecular organization of the mammalian translation system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 964–968.
4. Gross, S.R., Kinzy, T.G. (2007) Improper organization of the actin cytoskeleton affects protein synthesis at initiation, *Mol. Cell Biol.*, **27**, 1974–1989.
5. Morelli, J.K., Zhou, W., Yu, J., Lu, C., Vayda, M.E. (1998) Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue, *Plant Physiol.*, **116**, 1227–1237.
6. Carbonaro, M., O'Brate, A., Gianakakou, P. (2011) Microtubule disruption targets HIF-1 α mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression, *J. Cell Biol.*, **192**, 83–99.
7. King, M.L., Messitt, T.J., Mowry, K.L. (2005) Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte, *Biol. Cell*, **97**, 19–33.
8. Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T.R., Tomancak, P., Krause, H.M. (2007) Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function, *Cell*, **131**, 174–187.
9. Jansen, R.P., Niessing, D. (2012) Assembly of mRNA-protein complexes for directional mRNA transport in eukaryotes—an overview, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **13**, 284–293.
10. Parton, R.M., Davidson, A., Davis, I., Weil, T.T. (2014) Subcellular mRNA localisation at a glance, *J. Cell Sci.*, **127**, 2127–2133.
11. Buxbaum, A.R., Yoon, Y.J., Singer, R.H., Park, H.Y. (2015) Single-molecule insights into mRNA dynamics in neurons, *Trends Cell Biol.*, **25**, 468–475.
12. Piper, M., Lee, A.C., van Horck, F.P., McNeilly, H., Lu, T.B., Harris, W.A., Holt, C.E. (2015) Differential requirement of F-actin and microtubule cytoskeleton in cue-induced local protein synthesis in axonal growth cones, *Neural Dev.*, **10**, 3.
13. Katz, Z.B., Wells, A.L., Park, H.Y., Wu, B., Shenoy, S.M., Singer, R.H. (2012) β -Actin mRNA compartmentalization enhances focal adhesion stability and directs cell migration, *Genes Dev.*, **26**, 1885–1890.
14. Lenk, R., Ransom, L., Kaufmann, Y., Penman, S. (1977) A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells, *Cell*, **10**, 67–78.
15. Shestakova, E.A., Motuz, L.P., Gavrilova, L.P. (1993) Co-localization of components of the protein-synthesizing machinery with the cytoskeleton in G0-arrested cells, *Cell Biol. Int.*, **17**, 417–424.
16. Edmonds, B.T., Bell, A., Wyckoff, J., Condeelis, J., Leyh, T.S. (1998) The effect of F-actin on the binding and hydrolysis of guanine nucleotide by *Dictyostelium* elongation factor 1A, *J. Biol. Chem.*, **273**, 10288–10295.
17. Perez, W.B., Kinzy, T.G. (2014) Translation elongation factor 1A mutants with altered actin bundling activity show reduced aminoacyl-tRNA binding and alter initiation via eIF2 α phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **289**, 20928–20938.

18. Kaverina, I., Straube, A. (2011) Regulation of cell migration by dynamic microtubules, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **22**, 968–974.
19. Carson, J.H., Barbarese, E. (2005) Systems analysis of RNA trafficking in neural cells, *Biol. Cell*, **97**, 51–62.
20. Mahamid, J., Pfeffer, S., Schaffer, M., Villa, E., Danev, R., Cuellar, L.K., Förster, F., Hyman, A.A., Plitzko, J.M., Baumeister, W. (2016) Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery, *Science*, **351**, 1969–1972.
21. Castoldi, M., Popov, A.V. (2003) Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer, *Protein Expr. Purif.*, **32**(1), 83–88.
22. Sakamoto, T., Uezu, A., Kawachi, S., Kuramoto, T., Makino, K., Umeda, K., Araki, N., Baba, H., Nakanishi, H. (2008) Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain, *Genes Cells*, **13**, 3295–3312.
23. Patel, P.C., Fisher, K.H., Yang, E.C., Deane, C.M., Harrison, R.E. (2009) Proteomic analysis of microtubule-associated proteins during macrophage activation, *Mol. Cell Proteomics*, **8**, 2500–2514.
24. Özlü, N., Monigatti, F., Renard, B.Y., Field, C.M., Steen, H., Mitchison, T.J., Steen, J.J. (2010) Binding partner switching on microtubules and aurora-B in the mitosis to cytokinesis transition, *Mol. Cell Proteomics*, **9**, 336–350.
25. Gache, V., Waridel, P., Winter, C., Juhem, A., Schroeder, M., Shevchenko, A., Popov, A.V. (2010) Xenopus meiotic microtubule-associated interactome, *PLoS One*, **17**, e9248.
26. Volkov, V.A., Grissom, P.M., Arzhanik, V.K., Zaytsev, A.V., Renganathan, K., McClure-Begley, T., Old, W.M., Ahn, N., McIntosh, J.R. (2015) Centromere protein F includes two sites that couple efficiently to depolymerizing microtubules, *J. Cell Biol.*, **209**, 813–828.
27. Chuong, S.D., Good, A.G., Taylor, G.J., Freeman, M.C., Moorhead, G.B., Muench, D.G. (2004) Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells, *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 970–983.
28. Derbyshire, P., Menard, D., Green, P., Saalbach, G., Buschmann, H., Lloyd, C. W., Pesquet, E. (2015). Proteomic analysis of microtubule interacting proteins over the course of xylem tracheary element formation in Arabidopsis, *Plant Cell*, **27**, 2709–2726.
29. Hughes, J.R., Meireles, A.M., Fisher, K.H., Garcia, A., Antrobus, P.R., Wainman, A., Zitzmann, N., Deane, C., Ohkura, H., Wakefield, J.G. (2008) A microtubule interactome: complexes with roles in cell cycle and mitosis, *PLoS Biol.*, **22**, e98.
30. Sauer, G., Körner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E.A., Silljé, H.H. (2005) Proteome analysis of the human mitotic spindle, *Mol. Cell Proteomics*, **4**, 35–43.
31. Severin, F.F., Shanina, N.A., Shevchenko, A., Solovyanova, O.B., Korotkiy, V.V., Nadezhkina, E.S. (1997) A major 170 kDa protein associated with bovine adrenal medulla microtubules: a member of the centrosomin family? *FEBS Lett.*, **420**, 125–128.
32. Шанина Н.А., Иванов П.А., Чудинова Е.М., Северин Ф.Ф., Надеждина Е.С. (2001) Фактор инициации трансляции eIF3 способен связываться с микротрубочками в клетках млекопитающих, *Молекулярная биология*, **35**, 638–646.
33. Hasek, J., Kovarik, P., Valásek, L., Malínská, K., Schneider, J., Kohlwein, S.D., Ruis, H. (2000) Rpg1p, the subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* eIF3 core complex, is a microtubule-interacting protein, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **45**, 235–246.

34. Berg, J.M., Lee, C., Chen, L., Galvan, L., Cepeda, C., Chen, J.Y., Peñagarikano, O., Stein, J.L., Li, A., Oguro-Ando, A., Miller, J.A., Vashisht, A.A., Starks, M.E., Kite, E.P., Tam, E., Gdalyahu, A., Al-Sharif, N.B., Burkett, Z.D., White, S.A., Fears, S.C., Levine, M.S., Wohlschlegel, J.A., Geschwind, D.H. (2015) JAKMIP1, a Novel Regulator of Neuronal Translation, Modulates Synaptic Function and Autistic-like Behaviors in Mouse, *Neuron*, **88**, 1173–1191.
35. Jang, C.Y., Kim, H.D., Zhang, X., Chang, J.S., Kim, J. (2012) Ribosomal protein S3 localizes on the mitotic spindle and functions as a microtubule associated protein in mitosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **429**, 57–62.
36. Wang, S., Huang, J., He, J., Wang, A., Xu, S., Huang, S.F., Xiao, S. (2010) RPL41, a small ribosomal peptide deregulated in tumors, is essential for mitosis and centrosome integrity, *Neoplasia*, **12**, 284–293.
37. Chierchia, L., Tussellino, M., Guarino, D., Carotenuto, R., DeMarco, N., Campanella, C., Biffo, S., Vaccaro, M.C., (2015) Cytoskeletal proteins associate with components of the ribosomal maturation and translation apparatus in *Xenopus* stage I oocytes, *Zygote*, **23**, 669–682.
38. Venticinque, L., Jamieson, K.V., Meruelo, D. (2011) Interactions between laminin receptor and the cytoskeleton during translation and cell motility, *PLoS One*, **6**, e15895.
39. Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П., Лябин Д.Н. (2011) Y-бокс связывающий белок (YB-1) и его функции, *Успехи биологической химии*, **51**, 65–132.
40. Chernov, K.G., Mechulam, A., Popova, N.V., Pastre, D., Nadezhdina, E.S., Skabkina, O.V., Shanina, N.A., Vasiliev, V.D., Tarrade, A., Melki, J., Joshi, V., Baconnais, S., Toma, F., Ovchinnikov, L.P., Curmi, P.A. (2008) YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules, *BMC Biochem.*, **9**, e23.
41. Chernov, K.G., Curmi, P.A., Hamon, L., Mechulam, A., Ovchinnikov, L.P., Pastré, D. (2008) Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP, *FEBS Lett.*, **582**, 2875–2881.
42. Preitner, N., Quan, J., Nowakowski, D.W., Hancock, M.L., Shi, J., Tcherkezian, J., Young-Pearse, T.L., Flanagan, J.G. (2014) APC is an RNA-binding protein, and its interactome provides a link to neural development and microtubule assembly, *Cell*, **158**, 368–382.
43. Mili, S., Moissoglu, K., Macara, I.G. (2008) Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions, *Nature*, **453**, 115–119.
44. Villarin, J.M., McCurdy, E.P., Martínez, J.C., Hengst, U. (2016) Local synthesis of dynein cofactors matches retrograde transport to acutely changing demands, *Nat. Commun.*, **7**, 13865.
45. Moore, R.C., Durso, N.A., Cyr, R.J. (1998). Elongation factor-1 alpha stabilizes microtubules in a calcium/calmodulin-dependent manner, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **41**, 168–180.
46. Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A., Nishida, E. (1994) Microtubule severing by elongation factor 1 alpha, *Science*, **266**, 282–285.
47. Suda, M., Fukui, M., Sogabe, Y., Sato, K., Morimatsu, A., Arai, R., Motegi, F., Miyakawa, T., Mabuchi, I., Hirata, D. (1999) Overproduction of elongation factor 1alpha, an essential translational component, causes aberrant cell morphology by affecting the control of growth polarity in fission yeast, *Genes Cells*, **4**, 517–527.
48. Hashemzadeh-Bonehi, L., Curtis, P.S., Morley, S.J., Thorpe, J.R., Pain,

- V.M. (2003) Overproduction of a conserved domain of fission yeast and mammalian translation initiation factor eIF4G causes aberrant cell morphology and results in disruption of the localization of F-actin and the organization of microtubules, *Genes Cells*, **8**, 163–178.
49. Bisbal, M., Wojnacki, J., Peretti, D., Ropolo, A., Sesma, J., Jausoro, I., Cáceres, A. (2009) KIF4 mediates anterograde translocation and positioning of ribosomal constituents to axons, *J. Biol. Chem.*, **284**, 9489–9497.
 50. Campbell, E.M., Hope, T.J. (2003) Role of the cytoskeleton in nuclear import, *Adv Drug Deliv Rev.*, **55**, 761–771.
 51. Roth, D.M., Moseley, G.W., Glover, D., Pouton, C.W., Jans, D.A. (2007) A microtubule-facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins, *Traffic*, **8**, 673–686.
 52. Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C., Fujiwara, T. (2009) The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a Poly(A)- and eIF4A-dependent manner, *Mol. Cell*, **36**, 1007–1017.
 53. Fujiwara, Y., Kasashima, K., Saito, K., Fukuda, M., Fukao, A., Sasano, Y., Inoue, K., Fujiwara, T., Sakamoto, H. (2011) Microtubule association of a neuronal RNA-binding protein HuD through its binding to the light chain of MAP1B, *Biochimie.*, **93**, 817–822.
 54. Cheng, Y.C., Liou, J.P., Kuo, C.C., Lai, W.Y., Shih, K.H., Chang, C.Y., Pan, W.Y., Tseng, J.T., Chang, J.Y. (2013) MPT0B098, a novel microtubule inhibitor that destabilizes the hypoxia-inducible factor-1 α mRNA through decreasing nuclear-cytoplasmic translocation of RNA-binding protein HuR, *Mol Cancer Ther.*, **12**, 1202–1212.
 55. Sweet, T.J., Boyer, B., Hu, W., Baker, K.E., Collier, J. (2007) Microtubule disruption stimulates P-body formation, *RNA*, **13**, 493–502.
 56. Kedersha, N., Ivanov, P., Anderson, P. (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 494–506.
 57. Buchan, J.R. (2014) mRNP granules: Assembly, function, and connections with disease, *RNA biology*, 2014, **11**, 1019–1030.
 58. Anderson, P., Kedersha, N., Ivanov, P. (2015) Stress granules, P-bodies and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1849**, 861–870.
 59. Ivanov, P.A., Chudinova, E.M., Nadezhkina, E.S. (2003) Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation, *Exp. Cell Res.*, **290**, 227–233.
 60. Kwon, S., Zhang, Y., Matthias, P. (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response, *Genes and Development*, **21**, 3381–3394.
 61. Fujimura, K., Katahira, J., Kano, F., Yoneda, Y., Murata, M. (2009) Microscopic dissection of the process of stress granule assembly, *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 1728–1737.
 62. Kolobova, E., Efimov, A., Kaverina, I., Rishi, A.K., Schrader, J.W., Ham, A.J., Larocca, M.C., Goldenring, J.R. (2009) Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules, *Experimental Cell Research*, **315**, 542–555.
 63. Chernov, K.G., Barbet, A., Hamon, L., Ovchinnikov, L.P., Curmi, P.A., Pastré D. (2009) Role of microtubules in stress granule assembly: microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells, *J. Biol. Chem.*, **284**, 36569–3680.
 64. Nadezhkina, E.S., Lomakin, A.J., Shpilman, A.A., Chudinova, E.M., Ivanov, P.A. (2010) Microtubules

- govern stress granule mobility and dynamics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 361–371.
65. Tsai, N.P., Tsui, Y.C., Wei, L.N. (2009) Dynein motor contributes to stress granule dynamics in primary neurons, *Neuroscience*, **159**, 647–656.
66. Loschi, M., Leishman, C.C., Berardone, N., Voccacio, G.L. (2009) Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics, *Journal of Cell Science*, **122**, 3973–3982.
67. Чудинова Е.М., Надеждина Е.С., Иванов П.А. (2012) Клеточный ацидоз ингибирует образование, разборку и перемещения в цитоплазме стрессовых гранул, *Биохимия*, **77**, 1526–1535.
68. Cooper, J.R., Wordeman, L. (2009) The diffusive interaction of microtubule binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 68–73.
69. Helenius, J., Brouhard, G., Kalaidzidis, Y., Diez, S., Howard, J. (2006) The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends, *Nature*, **441**, 115–119.
70. Hinrichs, M.H., Jalal, A., Brenner, B., Mandelkow, E., Kumar, S., Scholz, T. (2012) Tau protein diffuses along the microtubule lattice, *J Biol. Chem.*, **287**, 38559–38568.
71. Ali, M.Y., Kremontsova, E.B., Kennedy, G.G., Mahaffy, R., Pollard, T.D., Trybus, K.M., Warshaw, D.M. (2007) Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **13**, 4332–4336.
72. Ayloo, S., Lazarus, J.E., Dodda, A., Tokito, M., Ostap, E.M., Holzbaur, E.L. (2014) Dynactin functions as both a dynamic tether and brake during dynein-driven motility, *Nat. Commun.*, **5**, 4807
73. Bartoli, K.M., Jakovljevic, J, Woolford, J.L.Jr., Saunders, W.S. (2011) Kinesin molecular motor Eg5 functions during polypeptide synthesis, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3420–3430.
74. Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y., Steinberg, G. (2014) Early endosome motility spatially organizes polysome distribution, *J. Cell Biol.*, **204**, 343–357.
75. Graber, T.E., Hébert-Seropian, S., Khoutorsky, A., David, A., Yewdell, J.W., Lacaille, J.C., Sossin, W.S. (2013) Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16205–16210.
76. El Fatimy, R., Davidovic, L., Tremblay, S., Jaglin, X., Dury, A., Robert, C., De Koninck, P., Khandjian, E.W. (2016) Tracking the Fragile X Mental Retardation Protein in a Highly Ordered Neuronal RiboNucleoParticles Population: A Link between Stalled Polyribosomes and RNA Granules, *PLoS Genet.*, **12**, e1006192.
77. Pichon, X., Bastide, A., Safieddine, A., Chouaib, R., Samacoits, A., Basyuk, E., Peter, M., Mueller, F., Bertrand, E. (2016) Visualization of single endogenous polysomes reveals the dynamics of translation in live human cells, *J. Cell Biol.*, **214**, 769–781.
78. Hirokawa, N., Tanaka, Y. (2015) Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases, *Exp. Cell Res.*, **334**, 16–25.
79. Davidovic, L., Jaglin, X.H., Lepagnol-Bestel, A.M., Tremblay, S., Simonneau, M., Bardoni, B., Khandjian, E.W. (2007) The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules, *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 3047–3058.
80. Takano, K., Miki, T., Katahira, J., Yoneda, Y. (2007) NXF2 is involved in cytoplasmic mRNA dynamics through interactions with motor proteins, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 2513–2521.

81. Song, T., Zheng, Y., Wang, Y., Katz, Z., Liu, X., Chen, S., Singer, R.H., Gu, W. (2015) Specific interaction of KIF11 with ZBP1 regulates the transport of β -actin mRNA and cell motility, *J. Cell Sci.*, **128**, 1001–1010.
82. Kislauskis, E.H., Zhu, X., Singer, R.H. (1997) beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility, *J. Cell Biol.*, **136**, 1263–1270.
83. Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., Singer, R.H. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1, *Nature*, **24**, 438, 512–515.
84. Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J.Q., Amieux, P.S., Holt, C.E. (2016) Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits, *Cell*, **166**, 181–192.
85. Simon, B., Masiewicz, P., Ephrussi, A., Carlomagno, T. (2015) The structure of the SOLE element of oskar mRNA, *RNA*, **21**, 1444–1453.
86. Kanai, Y., Dohmae, N., Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule, *Neuron*, **43**, 513–525.
87. Falley, K., Schütt, J., Iglauer, P., Menke, K., Maas, C., Kneussel, M., Kindler, S., Wouters, F.S., Richter, D., Kreienkamp, H.J. (2009) Shank1 mRNA: dendritic transport by kinesin and translational control by the 5'untranslated region, *Traffic.*, **10**, 844–857.
88. Gáspár, I., Sysoev, V., Komissarov, A., Ephrussi, A. (2017) An RNA-binding atypical tropomyosin recruits kinesin-1 dynamically to oskar mRNPs, *EMBO J.*, **36**, 319–333.
89. Jambor, H., Mueller, S., Bullock, S.L., Ephrussi, A. (2014) A stem-loop structure directs oskar mRNA to microtubule minus ends, *RNA*, **20**, 429–439.
90. Palacios, I.M., St Johnston, D. (2002) Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localization in the Drosophila oocyte, *Development*, **129**, 5473–5485.
91. Lu, W., Winding, M., Lakonishok, M., Wildonger, J., Gelfand, V.I. (2016) Microtubule-microtubule sliding by kinesin-1 is essential for normal cytoplasmic streaming in Drosophila oocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4995–5004.
92. Veeranan-Karmegam, R., Boggupalli, D.P., Liu, G., Gonsalvez, G.B. (2016) A new isoform of Drosophila non-muscle Tropomyosin 1 interacts with Kinesin-1 and functions in oskar mRNA localization, *J. Cell Sci.*, **129**, 4252–4264.
93. Mach, J.M., Lehmann, R. (1997) An Egalitarian–BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in Drosophila, *Genes Dev.*, **11**, 423–435.
94. Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A. (2016) Bicaudal D family of motor adaptors: linking Dynein motility to cargo binding, *Trends Cell Biol.*, **26**, 327–340.
95. Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X., Bullock, S.L. (2009) Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor, *Genes Dev.*, **23**, 1546–1558.
96. Navarro, C., Puthalakath, H., Adams, J.M., Strasser, A., Lehmann, R. (2004) Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate, *Nat. Cell Biol.*, **6**, 427–435.
97. Irion, U., St Johnston, D. (2007) Bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex, *Nature*, **445**, 554–558.