

# ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ

©2007 г.

А. В. СОРОКИН, Е. Р. КИМ,

Л. П. ОВЧИННИКОВ

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область*

I. Введение. II. Ran-зависимый ядерно-цитоплазматический транспорт белков. III. Ran-независимый ядерно-цитоплазматический транспорт белков. IV. Регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

В эукариотических клетках цитоплазма и ядро сообщаются через ядерные поровые комплексы, встроенные в ядерную мембрану. Ядерный поровый комплекс – NPC (nuclear pore complex), состоящий из ~30 различных белков нуклеопоринов [1], образует канал и регулирует ядерно-цитоплазматический транспорт различных типов РНК [2], мембранных белков (рецепторов) [3] и растворимых белков [4].

Ядерный поровый комплекс – это большой транспортер, пронизывающий ядерную мембрану. Ионы и маленькие нейтральные белки, не связывающиеся с нуклеопоринами, проникают через ядерный поровый комплекс за счет диффузии [5]. В этом случае они проходят через туннель диаметром 8–10 нм и длиной около 45 нм [6, 7] (рис. 1Б). Если молекулы связываются с нуклеопоринами,

---

*Принятые сокращения:* CGC – центральный селективный канал, cNLS – классический сигнал ядерной локализации, NES – сигнал ядерного экспорта, NLS – сигнал ядерной локализации, NPC – ядерный поровый комплекс, NTF2 – ядерный транспортный фактор 2, RanBD – Ran связывающий домен, RanBP – Ran связывающий белок, RanGAP1 – белок, активирующий GTPазу Ran, RanGDP – Ran в комплексе с GDP, RanGEF – фактор, обменивающий гуаниловый нуклеотид на Ran, RanGTP – Ran в комплексе с GTP.

*Адрес для корреспонденции:* ovchinn@vega.protres.ru

Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ 07-04-00403-а, грантами Президиума РАН по программам «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальная наука медицине».

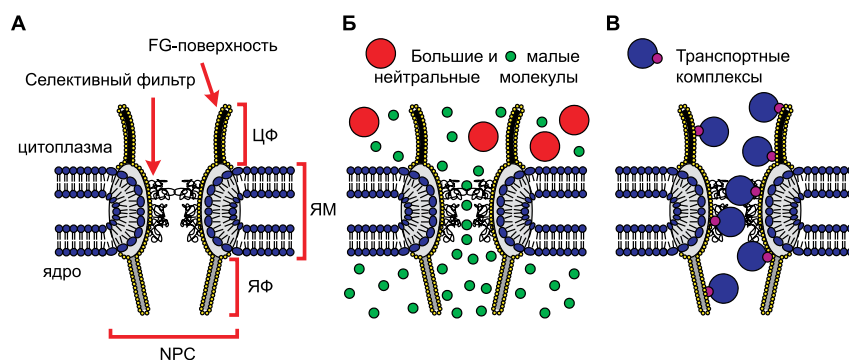


Рис. 1. Упрощенная модель транспорта через ядерную мембрану (модифицирован из [58]).

А. Схематичное изображение ядерного порового комплекса NPC. Обозначения: ЯМ – ядерная мембрана, ЦФ – цитоплазматическая фибрилла, ЯФ – ядерная фибрилла. «FG-поверхность» образована FG-нуклеопоринами. Считается, что именно за счет взаимодействий с FG-нуклеопоринами осуществляется активный транспорт белков через ядерный поровый комплекс. Селективный фильтр – несвернутые гидрофобные полипептидные цепи нуклеопоринов, выстилающих центральный канал NPC.

Б. Ионы и маленькие нейтральные белки способны проходить через селективный фильтр порового комплекса за счет диффузии.

В. Большие молекулы или комплексы проникают через NPC только в составе транспортных комплексов.

диаметр туннеля увеличивается до 40 нм [8, 9], и транспортировка идет намного быстрее (рис. 1В) [10, 11]. Селективный фильтр для малых белков представляет собой сеть из несвернутых гидрофобных полипептидных цепей нуклеопоринов, выстилающих центральный канал NPC (рис. 1Б). Несмотря на сравнительно большой диаметр туннеля, некоторые, даже маленькие белки (меньше 20–30 кДа), такие как гистоны, проходят через NPC только с посредниками [12]. Основным является транспорт при помощи посредника Ran (Ran-зависимый транспорт). Этот вид транспорта достаточно хорошо изучен. Главной отличительной его чертой является гидролиз GTP, катализируемый Ran. В этом процессе, помимо Ran, принимают участие и другие транспортные факторы.

## II. RAN-ЗАВИСИМЫЙ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ

Импорт/экспорт большинства белков, в том числе мембранных, рибосомных субчастиц и некоторых типов РНК осуществляется при участии большого эволюционно консервативного семейства транспортных факторов – кариоферин- $\beta$ . Большинство кариоферин- $\beta$  осуществляют либо ядерный импорт и называются импортинами, либо ядерный экспорт и называются экспортинами. Только некоторые из них принимают участие как в экспорте, так и в импорте. Большинство кариоферин- $\beta$  напрямую взаимодействуют со своими белками-субстратами, но иногда и через адаптерный белок. Наиболее изученным адаптерным белком является кариоферин- $\alpha$ , известный также под названием импортин- $\alpha$ . Импортины связываются с сигналом ядерной локализации – NLS (nuclear localization signal) – в транспортируемом белке и перемещают субстрат в ядро. Экспортины связываются с сигналом ядерного экспорта – NES (nuclear export sequence) – в транспортируемом белке и обеспечивают его транспортировку в цитоплазму. Помимо перечисленных, в транспорте дополнительно участвует целый набор транспортных белков. Одним из ключевых среди них является GTPаза Ran. Упрощенная модель Ran-зависимого ядерного транспорта схематически представлена на рис. 2. Роль Ran в транспорте белков подробнее описана ниже.

### СИГНАЛЫ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ТРАНСПОРТА И ТРАНСПОРТНЫЕ ФАКТОРЫ

В каждой эукариотической клетке происходит быстрый и направленный транспорт тысяч белков и РНК в ядро и из него. Большинство из них переносится с участием кариоферин- $\beta$ . Кариоферин- $\beta$  – это целое семейство белков. В клетках человека их не менее 20, а в дрожжах – 14 (табл. 1) [13, 14]. Значительное преобладание субстратов кариоферин- $\beta$  над числом кариоферин- $\beta$  поднимает вопрос, по каким признакам разные кариоферины узнают свои субстраты.

#### *Сигналы ядерной локализации и кариоферин- $\alpha$*

Транспорт белков в ядро впервые был показан для нуклеоплазмина и большого Т антигена вируса SV40. NLS нуклеоплазмина представляет собой два кластера положительно заряженных остатков, разделенных спейсером (KR-10aa-KKKL<sup>171</sup>), а NLS большого Т антигена – повтор положительно заряженных остатков (PKKKRKV<sup>132</sup>) [15]. Сигналы такого типа весьма распространены и консервативны. Их

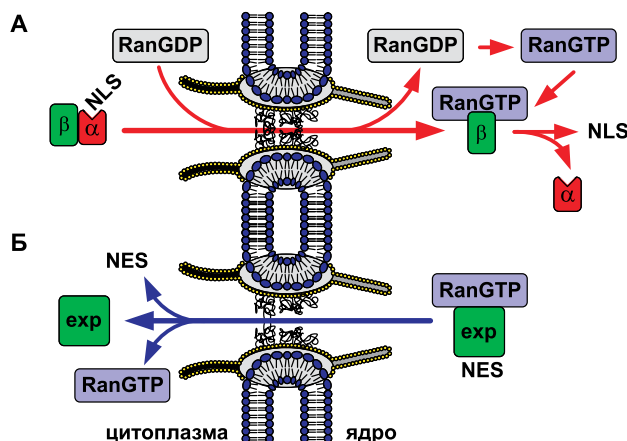


Рис. 2. Упрощенная модель Ran-зависимого ядерно-цитоплазматического транспорта белков.

А. Транспорт в ядро. Импорт белков с сигналом ядерной локализации NLS осуществляется гетеродимером кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 (обозначены  $\alpha$  и  $\beta$ ). Транспорт белков с участием только импортинов- $\beta$  на схеме не показан.

Б. Транспорт из ядра. Большая часть экспорта белков с сигналом ядерного экспорта NES осуществляется экспортином Crm1 (обозначен exp).

принято называть классическими или основными (cNLS, classical NLS, basic NLS).

Такие сигналы присутствуют в белках CBP80 (RRR-11aa-KRRK<sup>20</sup>), BRCA1 (KRKRRP<sup>508</sup> и PKKNNRLRRK<sup>615</sup>), ДНК-хеликазе Q1 (KK-15aa-KKRRK<sup>645</sup>), LEF-1 (KKKKRKEK<sup>382</sup>) и многих других [15]. Классические NLS узнаются кариоферинами- $\alpha$ . В клетках человека насчитывается, по крайней мере, 6 гомологичных членов этого семейства, которые подразделяют на подсемейства  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 и  $\alpha$ 3 [16].

Известны и другие NLS, которые могут узнаваться кариоферинами- $\alpha$ . Например, в NLS белка Mat $\alpha$ 2 полярные остатки чередуются с неполярными (VRILESWFAKNIENPYLDT<sup>159</sup>) [17], а в NLS с-Мус для перемещения в ядро важны пролин и аспартат на границе кластера из положительно заряженных остатков (PAAKRVKLD<sup>328</sup>) [18].

#### Сигналы ядерной локализации и импортины

Большинство импортинов связывает субстраты напрямую, без участия кариоферин- $\alpha$  [19, 20]. Часто сигналы ядерной локализации, узнаваемые импортинами, очень трудно определить. В некоторых случаях NLS содержат несколько положительно заряженных аминокислотных остатков, как например, в коровых гистонах (H2A, H2B,

Таблица 1.  
**Члены семейства карิโอферин-β (модифицирована из [14]).**

Карิโอферин-β позвоночных	Переносимые субстраты	Карิโอферин-β дрожжей	Переносимые субстраты
<b>импорт</b>			
импортин-β1	много белков, белки с cNLS в комплексе с карิโอферин-α, UsnRNP в комплексе со снуортином (snurportin)	Kap95	много белков, белки с cNLS в комплексе с карิโอферин-α
кардиоферин-β2/транспортин 1	hnRNPA1, гистоны, рибосомальные белки	Kap104	Nab2, Hrp1
транспортин SR1	SR белки	Mtr10/Kap111	Np13, Hrb1
транспортин SR2	HuR	· · · · ·	
импортин 4	гистоны, рибосом. белки	Kap123	гистоны, рибосом. белки
импортин 5/кардиоферин-β3	гистоны, рибосом. белки	Kap121	гистоны, рибосом. белки, Pho4 и др.
импортин 9	гистоны, рибосом. белки	Kap114	TBP, гистоны, Nap1p
импортин 7	HIV RTC, глюкокортикоидный рецептор, рибосом. белки	Nmd5/Kap119 Sxm1/Kap108	TFIIIS, Hog 1, и др. Lhp1, рибосом. белки
импортин 8	SRP19	· · · · ·	
импортин 11	UbcM2, rpl12	· · · · ·	
· · · · ·		Kap122	TFIIA
<b>экспорт</b>			
Сgm1/экспортин 1	белки с гидрофобными NES	Crml	белки с гидрофобными NES
экспортин-t	tPHK	Los1	tPHK
CAS	кардиоферин-α	Cse1	кардиоферин-α
экспортин 4	eIF5A, Pho4	· · · · ·	
экспортин 5	предшественники микроРНК	· · · · ·	
экспортин 6	профилин, актин	· · · · ·	
экспортин 7	p50Rho-GAP, 14-3-38	· · · · ·	
<b>импорт/экспорт</b>			
импортин 13	Rbm8, Ubc9, Pax6 (импорт); eIF1A (экспорт)	· · · · ·	
· · · · ·		Msn5	Pho4, и др., включая фосфорилированные белки (импорт); репликативный белковый комплекс A (Replication protein A complex) (экспорт)
<b>неохарактеризованные</b>			
RanBP6	не определены	· · · · ·	
RanBP17	не определены	· · · · ·	
· · · · ·		Kap120	не определены

Сопоставлены известные ортологи карิโอферин-β и их субстратов позвоночных и дрожжей. Многоочие в ячейках означает, что ортологи не найдены. Nmd5 и Sxm1 являются ортологами импортина 7, эти белки имеют высокую гомологию по первичной структуре с импортином 7. Два названия одного транспорта приведены через «/».

NES – сигнал ядерного экспорта, cNLS – классический сигнал ядерной локализации.

Н3, Н4) [21–23] и рибосомальных белках (gpS7, gpL5, gpL23a) [24]. В некоторых РНК-связывающих белках (Npl3p, Nor1p, Sof1p) обнаружены аргинин-глицин богатые NLS [25, 26]. Иногда NLS является относительно большим. Например, NLS M9 у hnRNP A1 состоит из 38 а.о., обогащен глицином и содержит незначительное число положительно заряженных остатков [27]. В некоторых случаях в качестве NLS определяется очень протяженный сегмент молекулы белка, что указывает на критичность пространственной укладки всей молекулы для узнавания импортинами-β [28].

Как видно из вышесказанного, NLS весьма разнообразны, поэтому их определение достаточно сложно и зачастую требует анализа пространственной структуры комплекса импортин/NLS-белок. Структурные исследования импортина-β1 с фрагментами его различных субстратов (кариоферин-α, SREBP-2, PTHrP) показали, что в каждом отдельном случае в формировании комплекса задействованы разные контакты [29–31]. Эти же работы показали, что кареоферин-β способен принимать несколько различных конформаций, подстраиваясь под определенный субстрат. Это объясняет, как ограниченное число импортинов может переносить огромное количество разнообразных субстратов, зачастую не имеющих сходства в аминокислотных последовательностях NLS.

#### *Сигналы ядерного экспорта и экспортины*

Экспортины также узнают специальные сигналы – сигналы экспорта из ядра [19, 20]. Самым распространенным и охарактеризованным является гидрофобный лейцин-богатый NES. Это неконсервативный мотив, содержащий 3 или 4 гидрофобных остатка (например, LPPLERLTL<sup>83</sup> у белка HIV Rev) [32]. Гидрофобный NES встречается у всех эукариот. Идентифицировано, по крайней мере, 75 белков, содержащих NES такого типа [33]. Гидрофобные NES обнаружены у многих факторов транскрипции и регуляторов клеточного цикла, у белка Rev HIV и у ингибитора протеинкиназы А, в которых гидрофобный NES был обнаружен впервые [32, 34]. Эти NES распознаются экспортином Crm1. Так же как и импортин-β1, Crm1 способен перемещать несколько субстратов без участия или с участием адаптерных белков [35–37]. Из ядра могут также экспортироваться белки, лишенные гидрофобных NES. Их экспорт осуществляется при участии специфичных экспортинов. Например, белки Pho4 и Mig1 без гидрофобных аминокислот в NES экспортируются при помощи кареоферина Msn5p [38, 39]. В этом случае транспорт сопряжен с фосфорилированием субстрата, из чего можно заключить, что сайт

фосфорилирования может входить в NES, или фосфорилирование способствует узнаванию NES экспортином [13, 40].

Стоит выделить экспортин CAS (Cse1p), который в комплексе с RanGTP транспортирует из ядра в цитоплазму кариоферин- $\alpha$ , обеспечивая, таким образом, рециркуляцию этого фактора.

Помимо белков, из ядра экспортируются несколько типов РНК [41]. За их транспортировку отвечают, по крайней мере, два экспортина. Это экспортин-t, обеспечивающий транспорт тРНК и узнающий часть ее структуры в качестве сигнала экспорта из ядра (NES), и экспортин 5, транспортирующий тРНК и предшественники микроРНК в цитоплазму, принимая шпильчатую структуру РНК с выступающим 3'-концом за NES [42, 43]. В транспорте большинства мРНК кариоферины не участвуют, и их роль выполняют белки семейства TAP/NFX [41].

#### СТРОЕНИЕ ЯДЕРНОГО ПОРОВОГО КОМПЛЕКСА, НУКЛЕОПОРИНЫ

Для того, чтобы ответить на вопрос, какие белки формируют ядерный поровый комплекс (NPC), были подробно изучены несколько систем из *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* и млекопитающих. Реконструкция структуры NPC на основании данных электронной микроскопии высокого разрешения показала, что архитектура всех NPC высоко консервативна. NPC имеет 8-лучевую симметрию, перпендикулярную мембране, и асимметричен относительно плоскости мембраны [44–47]. Упрощенно, комплекс состоит из трех подструктур: (1) цитоплазматических фибрилл, (2) центральной части и (3) ядерной сетки (рис. 3).

Центральная часть содержит 8 спиц, расположенных между ядерным и цитоплазматическим кольцами. Эта спицевая структура окружает центральную область, или центральный канал – CGC (central gated channel), через который осуществляется транспортировка. Такое строение свойственно и дрожжевым NPC, и NPC позвоночных. Однако NPC позвоночных больше по размерам и могут иметь дополнительные структуры. Масса NPC дрожжей – 44 МДа [1, 48], а позвоночных – 60 МДа [49]. Криоэлектронно-микроскопические исследования дрожжевых NPC показали, что их центральный кор имеет упрощенное строение и не содержит полостного кольца [47]. Электронная микроскопия показала, что от цитоплазматического кольца отходят цитоплазматические фибриллы длиной ~50 нм, а от ядерного кольца – ядерные фибриллы длиной ~100 нм, которые соединяются на дистальных концах, формируя корзинообразную структуру [46]. Было высказано предположение, что эти асимметричные нитчатые образования первыми вовлекаются в узнавание и связывание транспортных комплексов [50, 51].

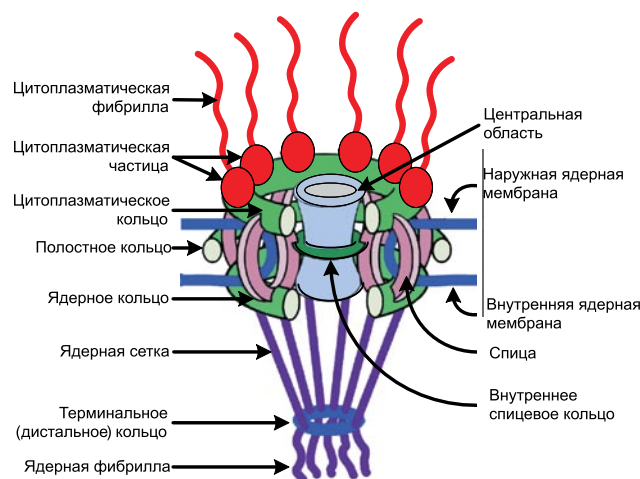


Рис. 3. Схематичное изображение строения NPC (модифицирован из [4]). Основные подструктуры NPC: цитоплазматические фибриллы, центральная часть и ядерная сетка. См. пояснения в тексте.

Протеомные исследования NPC млекопитающих и дрожжей показали, что NPC состоит приблизительно из 30 разных белков-нуклеопоринов, представленных большим числом копий (обычно 8, 16 или 32 копии, что следует из 8-лучевой симметрии) – общим числом 500–1000 на один NPC [1, 48]. Среди нуклеопоринов нет ни моторных белков, ни АТФаз/ГТФаз. Нуклеопорины разделяют на несколько семейств: (1) трансмембранные нуклеопорины (ТМ), которые закрепляют NPC в ядерной мембране. (2) FG-нуклеопорины, содержащие FG повторы (GLFG, FXFG или FG) и гидрофобные линкеры (см. также рис. 1А). Как подгруппу можно выделить FN-нуклеопорины, содержащие FN повторы (нуклеопорины Nup35/Nup53). (3) Недавно выявлен класс нуклеопоринов, которые содержат WD повторы или 7-лопастной пропеллерный мотив [4, 48, 52, 53]. Считается, что FG-нуклеопорины составляют половину от массы NPC (200–700 копий на один NPC). Большинство из них распределено симметрично относительно ядерной мембраны, и лишь несколько нуклеопоринов находятся только на ядерной или только на цитоплазматической стороне NPC [1].

FG-нуклеопорины имеют сайты связывания с кариоферинами. При прохождении через NPC все кариоферины связываются с FG-нуклеопоринами. Именно эти взаимодействия лежат в основе совре-



менной модели ядерно-цитоплазматического транспорта [4]. Предполагается, что асимметрично расположенные FG-нуклеопорины важны для направленности транспорта и высвобождения субстрата. Так, импортины часто проявляют более высокую аффинность к нуклеопоринам ядерной поверхности NCL, а экспортины – цитоплазматической [54–57]. Мажорным компонентом цитоплазматических фибрилл является нуклеопорин RanBP2/Nup358 (21 молекула на одну фибриллу). Процесс транспорта в ядро начинается со связывания транспортного комплекса с этим FG-нуклеопорином [58]. Цитоплазматическое кольцо обогащено нуклеопорином Nup214, ядерное кольцо и фибриллы – нуклеопорином Nup153. Центральная область ядерного порового комплекса представлена так называемыми Nup62-комплексами, мажорными белками которых являются Nup62, Nup58, Nup54. Сводная информация по всем нуклеопоринам представлена в табл. 2.

#### МОДЕЛЬ Ran-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА

Предположение о центральной роли Ran в транспорте белков в ядро первоначально базировалось на двух фактах: (1) мутации по Ran приводили к нарушениям в транспорте белков в ядро *in vivo* [59, 60]; (2) Ran был охарактеризован как цитоплазматический компонент, необходимый для перемещения NLS-содержащих субстратов через ядерную мембрану *in vitro* [61, 62]. Прямая связь между Ran и транспортом в ядро была установлена после открытия Ran-связывающих белков – RanBP (Ran binding protein) [63]. Изучение этих факторов и их взаимодействия с Ran позволило прийти к согласованию общей схемы транспорта в ядро белков с NLS (рис. 4). Эта модель не является окончательной, т.к. постоянно обнаруживаются новые участники и открываются новые взаимодействия. С открытием новых Ran-связывающих белков постоянно уточняются механизмы транспортировки белков, которые не содержат cNLS. Более того, сравнительно недавно обнаружен радикально другой механизм транспортировки – Ran-независимый.

#### *Ran, регуляторы Ran*

Основной ядерно-цитоплазматический транспорт управляется маленькой GTPазой Ran, которая выполняет основную роль в формировании различных транспортных комплексов (рис. 4). Ran – мажорный, предпочтительно ядерный 25 кДа белок [64]. Как и большинство GTPаз [65], Ran гидролизует GTP очень медленно, вследствие чего его нуклеотид-связанный статус регулируется через

Таблица 2.  
**Нуклеопорины дрожжей и позвоночных (модифицирована из [4]).**

Нуклеопорины позвоночных	Нуклеопорины дрожжей	Локализация	Мотив
Nup153b	Nup1 (114)	ядерная	FXFG
Nup62	Nsp1 (87)	симметричная	FG, FXFG
Nup50	Nup2 (78)	преимущественно ядерная	FXFG
NLP1/hCG1 (45)	Nup42	цитоплазматическая	FG
Nup58, Nup45	Nup49	симметричная	GLFG <sup>a</sup> , FG <sup>n</sup>
Nup35	Nup53	симметричная	
Nup35	Nup59	симметричная	
Nup54	Nup57	симметричная	GLFG <sup>a</sup> , FG <sup>n</sup>
Nup88	Nup82	цитоплазматическая	
Nup107	Nup84	симметричная	
Nup75/Nup85	Nup85	симметричная	
Nup93	Nic96	симметричная	
Nup98	Nup100	преимущественно цитоплазматическая	GLFG
Nup98	Nup116	преимущественно цитоплазматическая	FG, GLFG
Nup98	Nup145N (60)	преимущественно ядерная	GLFG
Nup160	Nup120	симметричная	
Nup133	Nup133	симметричная	
Nup96	Nup145C (85)	симметричная	
Nup155	Nup157	симметричная	
Nup155	Nup170	симметричная	
Nup214/CAN	Nup159	цитоплазматическая	FG
Nup188	Nup188	симметричная	
Nup205	Nup192	симметричная	
hGle1 (85)	Gle1(62)	преимущественно цитоплазматическая	
Rae1/Gle2 (41)	Gle2(41)	симметричная	WD
Trp (266)	Mlp1 (218)	ядерная	
Trp (266)	Mlp2 (195)	ядерная	
Seh1 (40)	Seh1 (39)	симметричная	WD
· · · · ·	Nup60	ядерная	FXF
· · · · ·	Ndc1 (74)	в мембране	TM
· · · · ·	Pom34	в мембране	TM
· · · · ·	Pom152	в мембране	TM
Pom121	· · · · ·	в мембране	FG, TM
Gp210	· · · · ·	в мембране	TM
Nup358/RanBP2	· · · · ·	цитоплазматическая	FXFG
ALADIN (60)	· · · · ·	?	WD
Nup37	· · · · ·	?	WD
Nup43	· · · · ·	?	WD

Ортологи основных нуклеопоринов дрожжей и позвоночных объединены. Общая номенклатура нуклеопоринов содержит числовое обозначение, отражающее предсказанную молекулярную массу в кДа. Для некоторых нуклеопоринов с устоявшимися названиями масса указана в скобках. Два названия одного нуклеопорина приведены через «/». Многоточие в ячейках означает, что ортологи не найдены. TM – трансмембранные нуклеопорины. Локализация нуклеопоринов указана основываясь, в основном, на данных по дрожжевым нуклеопоринам. (<sup>a</sup> – у дрожжевых нуклеопоринов; <sup>n</sup> – у позвоночных.)

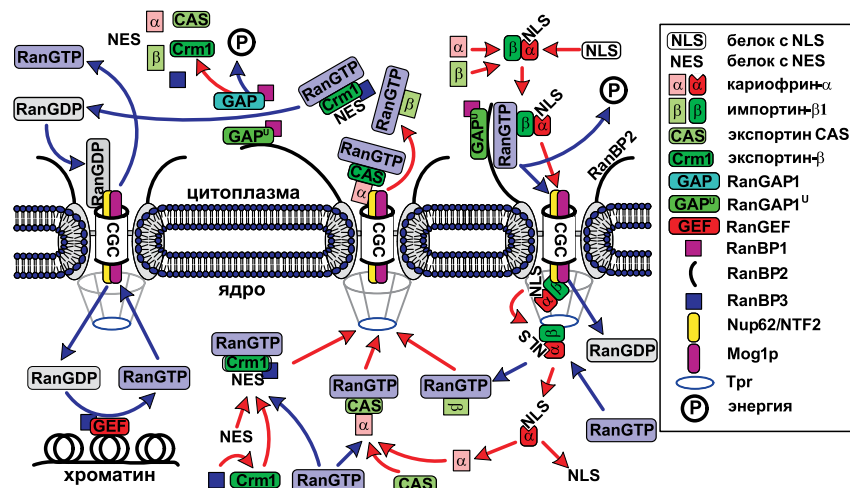


Рис. 4. Общая схема транспорта в ядро cNLS/NES-содержащих белков.

Общепринятая модель транспорта cNLS/NES-содержащих белков через NPC включает следующие стадии: (1) формирование импортируемого транспортного комплекса кариоферин-α/импортин-β1/cNLS-белок в присутствии RanGAP1<sup>U</sup> и невысокой концентрации RanGTP в цитоплазме; посадка импортируемого транспортного комплекса на цитоплазматические фибриллы (см. верхний правый угол рис.). (2) Переход через центральный канал (CGC). (3) Высвобождение кариоферина-α/cNLS-белка в нуклеоплазму, стимулированное RanGTP. (4) Удержание импортина-β1 в NPC и перемещение в цитоплазму в комплексе с RanGTP (см. нижний правый угол рис.). (5) После диссоциации комплекса кариоферин-α/cNLS-белок, кариоферин-α экспортируется из ядра в комплексе с CAS/RanGTP. Белки, содержащие NES, экспортируются в комплексе с Crm1/RanGTP (см. низ центральной части рис.). (6) На выходе из NPC все экспортируемые транспортные комплексы диссоциируют из-за гидролиза GTP на Ran, стимулируемого RanGAP1 или RanGAP1<sup>U</sup> (см. верх центральной части рис.). (7) RanGDP импортируется в ядро при помощи фактора NTF2 (см. верхний левый угол рисунка). (8) В ядре RanGEF переводит Ran из GDP-связанной формы в GTP-связанную форму. Минимальный цитоплазматический пул RanGTP поддерживается благодаря транспортному фактору Mog1p (см. нижний левый угол рис.). Детали схемы подробно изложены в тексте.

взаимодействие с различными эффекторными белками. Они включают: (1) белок, активирующий GTPазу Ran – RanGAP1 (Ran GTPase activating protein), (2) белок, активирующий RanGAP – RanBP1, (3) фактор, обменивающий гуаниловый нуклеотид на Ran – RanGEF (Ran guanine exchange factor), и (4) фактор, активирующий RanGEF – RanBP3 (обобщено в табл. 3).

Таблица 3.  
**Ran-связывающие белки позвоночных**  
 (модифицирована из [102]).

Название белка	Форма Ran	Функции
<b>Регуляторы</b>		
RanGEF/RCC1	GDP/GTP	Обменивает гуаниловый нуклеотид на Ran
RanGAP	GTP	Активирует GTPазу Ran
RanBP1	GTP	Коактиватор RanGAP
RanBP2	GTP	Коактиватор RanGAP, связывает SUMO-модифицированный RanGAP (RanGAP <sup>U</sup> )
RanBP3	GTP	Кофактор Crm1: активирует RanGEF
Nup50/NPAP60	GTP	Связывает кариоферин- $\alpha$ и другие кариоферины; кофактор?
NTF2	GDP	Импортирует Ran
NXT1/p15	GTP	Кофактор Crm1
Mog1	GTP	Экспортирует Ran
<b>Переносчики</b>		
импортин- $\beta$ 1	GTP	Импортирует cNLS-содержащие белки в комплексе с кариоферином- $\alpha$ и др. белки; связывает импортин 7 и RanBP8
кариоферин-b2/ транспортин 1	GTP	Импортирует hnRNPA1, гистоны, рибосомальные белки
транспортин SR	GTP	Импортирует SR белки
Hmtr10	GTP	?
импортин 7	GTP	Импортирует HIV RTC, глюкокортикоидный рецептор, рибосомальные белки
импортин 11	GTP	Импортирует UbcM2, gpL12
импортин 5/ кариоферин-b3	GTP	Импортирует гистоны, рибосомальные белки
RanBP16	GTP	?
RanBP8	GTP	?
экспортин 5	GTP	Экспортирует предшественники микроРНК
Crm1/экспортин 1	GTP	Экспортирует белки с гидрофобными NES, снурпорин 1
CAS	GTP	Экспортирует кариоферин- $\alpha$
экспортин t	GTP	Экспортирует тРНК
экспортин 4	GTP	Экспортирует eIF5A

Приведены некоторые Ran-связывающие белки. Указана форма Ran, с которой они связываются, и известные функции. Два названия одного белка приведены через «/».

RanGAP1 усиливает GTPазную активность Ran примерно в 10000 раз, а в присутствии RanBP1 ~ в 100000 раз [66]. RanGAP1 обнаруживается только в цитоплазме [67] или, после суморилирования (образования конъюгатов с белком SUMO-1) (RanGAP1<sup>U</sup>), связывается с доменом RanBD (Ran binding domain) нуклеопорина RanBP2 (Nup358) и локализуется на фибриллах цитоплазматической поверхности NPC (рис. 4 и 5) [68]. RanBP1 перемещается между цитоплазмой и ядром, но преимущественно локализуется в цитоплазме [69]. RanGEF (другое название – RCC1), восстанавливающий пул GTP-связанной формы Ran, локализуется исключительно в ядре в комплексе с гистонами H2A и H2B (примерно одна молекула RanGEF на нуклеосому) [70]. RanGEF ускоряет обмен нуклеотидов на Ran примерно в 10000 раз [71]. RanBP3 перемещается между ядром и цитоплазмой, но локализуется преимущественно в ядрах [72]. RanBP3 связывается с RanGEF и стимулирует его GEF активность по обмену GDP на GTP на Ran в 10 раз [73].

Строгая локализация RanGAP1 в цитоплазме и RanGEF в ядре приводит к тому, что Ran в комплексе с GTP (RanGTP) находится преимущественно в ядре, а в комплексе с GDP (RanGDP) – в цитоплазме. В результате возникает градиент RanGTP, обуславливающий направленность транспорта.

#### *Посадка комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок на NPC*

В экспериментах *in vitro* по изучению транспорта в ядро были идентифицированы два цитозольных компонента, достаточных для связывания cNLS-содержащих белков с ядерной мембраной: это кариоферин- $\alpha$ , который узнавал cNLS, и импортин- $\beta$ 1, который связывался с кариоферином- $\alpha$  и взаимодействовал с NPC через FG повторы FG-нуклеопоринов [74–77]. Описывая механизм Ran-зависимого транспорта белков в этом обзоре, мы сконцентрируем основное внимание на транспорте комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок, так как транспортировка белков с неклассическими NLS имеет лишь одно принципиальное отличие: кариоферин- $\alpha$  не участвует в транспорте, а NLS-содержащий белок узнается непосредственно кариоферином- $\beta$ .

Первым этапом посадки на NPC является взаимодействие комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок с белком RanBP2 (Nup358), нуклеопорином, являющимся компонентом цитоплазматических фибрилл [78, 79] (рис. 3). RanBP2 содержит несколько повторов FXFG и 4 домена RanBD. В составе NPC есть и другие

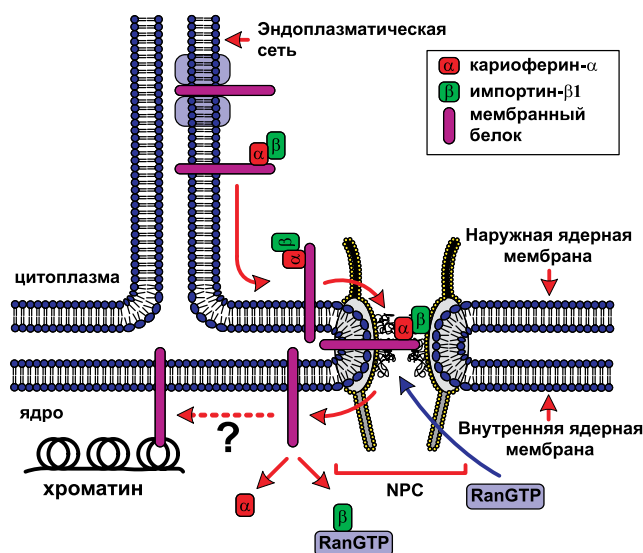


Рис. 5. Упрощенная схема транспорта в ядро белков внутренней ядерной мембраны (модифицирован из [104]).

нуклеопорины, содержащие повторы FXFG, с которыми может взаимодействовать комплекс кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок. Тем не менее, при низком уровне RanGTP аффинность импортина- $\beta$ 1 к этим нуклеопоринам незначительна, тогда как к RanBP2 – достаточно высока [80]. Таким образом, специфичность связывания импортина- $\beta$ 1 с RanBP2 является RanGTP-зависимой: вероятно, RanGTP напрямую вовлекается во взаимодействие импортина- $\beta$ 1 с доменами RanBD нуклеопорина RanBP2 [57].

Известно, что димер кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 нестабилен в присутствии RanGTP. Следовательно, во время посадки комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок на RanBP2 должен быстро осуществиться гидролиз GTP. Как уже отмечалось выше, помимо растворимой формы RanGAP1, есть и RanGAP1<sup>U</sup>, которая находится в комплексе с RanBP2. В свободном виде импортин- $\beta$ 1 существенно подавляет активность RanGAP1 [81, 82], но после взаимодействия с доменами RanBD RanBP2 ингибирующий эффект импортина- $\beta$ 1 пропадает [82].

Все эти данные позволяют прийти к заключению, что посадка транспортного комплекса на NPC – это RanGTP-зависимый процесс, требующий быстрого гидролиза GTP для поддержания комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок в стабильном состоянии.

Минимальный пул RanGTP в цитоплазме поддерживается благодаря транспортному фактору Mog1p, который обладает сродством к Ran в GTP-связанной форме и перекачивает его из ядра в цитоплазму [83].

*Прохождение комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок через центральный канал ядерной поры*

Чтобы достичь ядерной поверхности ядерного порового комплекса, cNLS-содержащий белок должен переместиться приблизительно на 40 нм от места стыковки на кончиках фибрилл до цитоплазматической поверхности центрального канала порового комплекса CGC (central gated channel) и еще 30 нм через CGC до ядерной поверхности. Первые 40 нм пути могут быть преодолены за счет изгибания цитоплазматической фибриллы. В результате такого изгиба кончик фибриллы с транспортным комплексом приближается к CGC [80, 84]. После гидролиза GTP транспортный комплекс высвобождается в непосредственной близости от CGC. На данный момент детали перемещения комплекса через CGC изучены недостаточно хорошо. Тем не менее, мы можем себе представить общую последовательность событий в упрощенном виде. Сразу после освобождения от фибриллы транспортный комплекс связывается с нуклеопорином p62 и транспортным фактором NTF2 (nuclear transport factor) на цитоплазматической поверхности NPC [85–87]. NTF2 – маленький гомодимерный белок, который обеспечивает однонаправленное перемещение RanGDP-транспортного комплекса из цитоплазмы в ядро. Быстрое перемещение NTF2/RanGDP в ядро обусловлено тем, что NTF2 взаимодействует напрямую с FG-нуклеопоринами (с низкой аффинностью). NTF2 связывается только с GDP формой Ran: NTF2 связывается с областью Switch II RanGDP, конформация которой сильно изменяется при переходе Ran в GTP форму [88]. Этим определяется однонаправленность переноса, так как Ran переходит в GTP форму практически сразу после выхода из NPC в ядро. Пройдя через CGC, на ядерной поверхности ядерного порового комплекса транспортный комплекс связывается с Nup62, после чего перемещается к «причалу» – нуклеопорину Nup153, где подвергается разборке [57].

*Разборка комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок*

Разборка транспортного комплекса происходит, по крайней мере, в три стадии: (1) Nup153, белок ядерной сетки NPC, фиксирует транспортный комплекс за счет взаимодействия своих FG-повторов с импортином- $\beta$ 1. В присутствии GTP и растворимого фактора (воз-

можно Ran), связь Nup153 с импортином- $\beta$ 1 нарушается [57]. (2) RanGTP, концентрация которого в ядре очень высока, связывается с транспортным комплексом и вызывает диссоциацию импортина- $\beta$ 1 из комплекса с кариоферин- $\alpha$ /cNLS-белком [81, 89, 90]. (3) Диссоциация импортина- $\beta$ 1 из комплекса приводит к ослаблению аффинности кариоферина- $\alpha$  к cNLS-белку, в результате чего последний высвобождается в нуклеоплазму.

На данный момент не известно, является ли диссоциация комплекса от Nup153 и диссоциация импортина- $\beta$ 1 от кариоферина- $\alpha$ /cNLS-белка одновременными или отдельными событиями. Белок Trg, один из компонентов ядерной сетки NPC, также вовлечен в разборку комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1/cNLS-белок, но роль его менее понятна [57]. Trg, так же как и Nup153, связывается с комплексом кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1; в присутствии GTP и растворимого фактора (возможно, Ran) эта связь нарушается. Однако, Trg связывается с комплексом кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 в отсутствие cNLS-белка. Предполагается, что Trg служит для удержания импортина- $\beta$ 1 в непосредственной близости от NPC. Это согласуется с тем наблюдением, что импортин- $\beta$ 1 не распространяется по нуклеоплазме после перехода через ядерную мембрану [76].

#### *Перемещение белков из ядра в цитоплазму*

Ядерно-цитоплазматический транспорт – это постоянный процесс, следовательно, транспортные факторы должны возвращаться на свои первоначальные места для обеспечения следующих раундов транспортировки.

Механизм такой рециркуляции был продемонстрирован на нескольких транспортных факторах. Импортин- $\beta$ 1 связывается с RanGTP и в этом комплексе возвращается в цитоплазму [91]. Это общий принцип рециркуляции импортинов, но есть случаи, когда импортины возвращаются в цитоплазму в комплексе с другим белком-субстратом. Так например, импортин 13 переносит в ядро белки Rbm8, Ubc9, Pax6, а в другую сторону – eIF1A [92].

Кариоферин- $\alpha$  после диссоциации в ядре от импортина- $\beta$ 1 формирует тройственный комплекс с RanGTP и CAS (cellular apoptosis susceptibility gene), и в такой форме он транспортируется обратно в цитоплазму [93, 94].

Механизм транспортировки белков с NES из ядра в цитоплазму сходен с транспортировкой белков с неклассическими NLS: для транспортировки требуется только экспортирующий кариоферин- $\beta$  и RanGTP. Самым распространенным экспортином является Crm1.



В транспортировку NES-содержащих белков с участием Crm1 вовлекается еще один фактор – RanBP3. После связывания с RanBP3 у Crm1 значительно увеличивается сродство к RanGTP и белкам с гидрофобными NES [95]. Такой четверичный комплекс транспортируется в цитоплазму. Субстраты, лишенные гидрофобных NES, тоже встречаются, и они имеют свои специфичные экспортины (см. главу II).

Характерной чертой любого типа Ran-зависимого экспорта является транспортировка через NPC комплекса кариоферин- $\beta$ /RanGTP. Взаимодействие между кариоферинами- $\beta$  и RanGTP очень прочное. Оно разрушается лишь при переходе Ran в GDP-связанную форму, поэтому для освобождения кариоферина- $\beta$  (и переносимого NES-содержащего белка) требуется привлечение RanGAP1<sup>U</sup> сразу на выходе из ядерного порового комплекса или RanGAP1 в цитоплазме. RanGAP1 активирует GTPазную активность Ran в 100000 раз [96]. Но RanGTP не полностью доступен для RanGAP1 в комплексе кариоферин- $\beta$ /RanGTP. Доступ облегчается при участии фактора RanBP1, что приводит к увеличению активности GTPазы еще на порядок [96]. После гидролиза GTP комплекс кариоферин- $\beta$ /RanGTP/(субстрат)/(RanBP3) распадается, и RanGDP при помощи NTF2 возвращается в ядро, причем RanBP3 возвращается в ядро преимущественно в комплексе с импортином- $\alpha 3$  [72].

Механизм транспорта в ядро RanGDP фактором NTF2 сходен с механизмом транспортировки при помощи кариоферин- $\beta$ . Правда, не совсем понятно, как NTF2 возвращается в цитоплазму: пока еще не обнаружены факторы, которые могли бы быть задействованы в экспорте NTF2. Но NTF2 – это маленький гомодимерный 28 кДа белок, и его перемещение легко укладывается в хорошо известную модель транспорта белков до 60 кДа за счет диффузии.

#### *Ran-связывающие белки*

Используя разные подходы, было идентифицировано несколько Ran-связывающих белков [97–100], которые можно разделить на три основных семейства. (1) Члены первого семейства содержат хорошо охарактеризованный Ran-связывающий домен RanBD – RanBP1, RanBP2 и RanBP3. (2) Белки второго семейства содержат в N-концевой части приблизительно 150 аминокислотных остатков, вовлеченных во взаимодействие с RanGTP, чем и ограничивается сходство между ними. В это семейство входят импортин- $\beta 1$ , RanBP5, RanBP7, RanBP8, CAS, Crm1, экспортин t.

Белки этих двух семейств не конкурируют за сайты связывания на RanGTP, что позволяет формироваться тройственным комплексам с

участием белков обоих семейств (например, RanBP1/RanGTP/RanBP5) [101]. (3) Третье семейство белков не содержит Ran-связывающие последовательности, характерные для белков первых двух семейств. Транспортин 1 – один из членов этого семейства [27].

Ran-связывающие белки первого типа вовлекаются в транспортировку белков с NLS/NES в комплексе с кариоферинами-β. Их роль в транспорте уже описана. Члены двух других семейств тоже выступают в роли транспортеров, однако, они напрямую взаимодействуют с переносимым белком – им не требуются адаптерные белки, такие как кариоферин-α. В табл. 3 приведены известные функции некоторых Ran-связывающих белков [102].

#### ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ ВНУТРЕННЕЙ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ

Белки внутренней ядерной мембраны – INM (inner nuclear membrane) – вовлечены в формирование ламины, хроматина и ядерной мембраны, функционируют как факторы транскрипции. Для достижения внутренней ядерной мембраны белки INM должны пройти через NPC. После синтеза на рибосомах мембранные белки оказываются в мембране эндоплазматической сети – ЭС. Как же INM-белки попадают в ядро? Поскольку внешняя ядерная мембрана ONM (outer nuclear membrane) продолжается и функционально эквивалентна ЭС, то белки INM могут перемещаться диффузией по мембране ЭС и ONM, достигая ядерного порового комплекса и за счет диффузии проходить через него, а оказавшись на INM, специфично удерживаться в ядре за счет взаимодействия с элементами ядерной структуры (рис. 5) [103, 104].

Это самое простое объяснение, но не стоит забывать, что диффузия через ядерный поровый комплекс существенно ограничивается селективным фильтром в центральном канале. Недавние исследования показали, что транспорт мембранных белков через NPC требует энергетических затрат [105], что свидетельствует в пользу наличия активного транспорта в дополнение или вместо пассивного транспорта за счет диффузии. Энергетические затраты могут требоваться для перестройки ядерного порового комплекса при прохождении белков INM через него или для транспорта по Ran-зависимому механизму. Недавно было продемонстрировано, что белки Neh1 и Neh2 транспортируются через NPC по кариоферин-α/импортин-β1/Ran-зависимому механизму [3]. Как и в случае растворимых белков, эти белки содержат cNLS. Более того, последовательности NLS обнаруживаются и в других белках INM: в рецепторе ламина В, LAP1, LAP2β, эмерине, MAN1 и LEM2 [106]. Предполагается, что в

транспортировку белков INM вовлечен Nup170, так как именно он играет основную роль в регуляции проницаемости канала NPC [107].

Рецепторы стероидных гормонов перемещаются в ядро после взаимодействия с гормоном в цитоплазме. Эти рецепторы функционируют в ядре как факторы транскрипции, собирая транскрипционные комплексы на гормон-специфичных элементах ДНК. Андрогеновый, эстрогеновый и глюкокортикоидный рецепторы содержат по два NLS: NLS-1 – классический, NLS-2 содержит около 200 а.о. и перекрывается с лиганд-связывающим доменом LBD (ligand-binding domain) [108–114]. NLS-1 глюкокортикоидного рецептора взаимодействует с комплексом кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 и импортином 7; NLS-2 – с импортином 7 или импортином 8. Интересным оказалось то, что связывание комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1, импортина 7 или импортина 8 с глюкокортикоидным рецептором является лиганд-независимым [115]. Таким образом, популярная модель, согласно которой связывание с лигандом приводит к диссоциации от рецептора шаперона Hsp90, маскирующего NLS, оказалась неверна. Вместо этого, связывание лиганда может регулировать некие шаперон-зависимые процессы, которые происходят с рецептором и/или NPC после узнавания NLS транспортными факторами [115–117]. Известно также, что шапероны усиливают взаимодействие рецепторов с цитоскелетом, то есть способствуют их удержанию в цитоплазме [118].

Сигналы и транспортные факторы, вовлеченные в транспорт рецепторов, до сих пор мало изучены. Области, которые могут служить сигналами NES, обнаружены для многих рецепторов [119, 120], но анализ последовательностей полусотни известных рецепторов выявил лишь один типичный гидрофобный NES, который может узнаваться Crm1 [121]. Тем не менее, использование лептомицина В, который специфично ингибирует Crm1, показало, что этот кариоферин вовлечен в экспорт рецепторов. Однако данные на этот счет противоречивы, и другие исследователи получили противоположный результат [122, 123]. Основываясь на этих данных, можно заключить, что экспорт рецепторов может быть и Crm1-зависимым, и Crm1-независимым, что, возможно, определяется клеточными условиями. Высказано предположение, что рецепторы узнаются при помощи посредников. Так, белки семейства 14-3-3 и коактиваторы p160, связывающиеся с рецепторами, содержат NES и могут быть адаптерами, обеспечивающими Rap-зависимый (Crm1-зависимый) экспорт [124, 125]. Более того, экспорт некоторых рецепторов может быть  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым и осуществляться при помощи калретикулина (см. главу III) [126].

### III. Ran-НЕЗАВИСИМЫЙ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ

Ядерно-цитоплазматический транспорт, опосредованный системой кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1, зависит от Ran и гидролиза GTP, катализируемого Ran. Описаны альтернативные механизмы, которые отличаются от рассмотренного классического Ran-зависимого транспорта. Так например, альтернативные механизмы транспортировки описаны для  $\beta$ -катенина, импортина- $\beta$ 1, транспортина 1, Ctm1, экспортина t, hnRNP K, кальмодулина, ERK, NHP6A, импортина- $\alpha$ , белков семейства STAT, TIAR и TIA-1, ингибитора cAMP-зависимой киназы (PKI, protein kinase A inhibitor) и глюкокортикоидного рецептора [126–140].

Эксперименты *in vitro* показали, что связывание  $\beta$ -катенина с NPC не требует дополнительных факторов и ингибируется в присутствии импортина- $\beta$ . Это свидетельствует в пользу того, что сайты связывания  $\beta$ -катенина и импортина- $\beta$  на NPC перекрываются [127]. Агглютинин из зародышей пшеницы, WGA (wheat germ agglutinin) – лектин, который связывается с GlcNAc-модифицированными нуклеопоринами, такими как Nup62, – ингибировал импорт  $\beta$ -катенина. В экспериментах *in vitro* было показано, что перемещение  $\beta$ -катенина в ядро зависит от гидролиза GTP, но может идти и в отсутствие Ran. Роль Ran в этом процессе, видимо, может играть другая родственная GTPаза. На основе этих результатов, было высказано предположение, что такие белки, как  $\beta$ -катенин (содержащие повторы ARM, *armadillo*), способны связываться с NPC и перемещаться в ядро независимо от системы кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 и RanGTP [127].

В отсутствие кариоферина- $\alpha$  и cNLS-содержащего субстрата, импортина- $\beta$ 1 для перемещения в ядро не требуется Ran [130]. Транспорт ингибируется WGA, но не чувствителен к понижению температуры, что странно. Удаление ATP снижает эффективность перехода.

Переход транспортина 1 из цитоплазмы в ядро и обратно не зависит от GTP и ATP, но ингибируется WGA и понижением температуры. По-видимому, для транспортировки транспортина 1 используются другие источники энергии [136]. Зависимость переноса от температуры говорит о том, что для транслокации транспортина 1 могут быть важны определенные, зависящие от температуры конформации NPC. Ингибирование транспорта под действием WGA подтверждает, что транспортировка осуществляется через NPC.

Транспорт Ctm1 также осуществляется альтернативным способом, но детали его транслокации не исследованы [129]. Ранее было

установлено, что *Crml* связывается с *Nup214* [141]. Причем оказалось, что именно этот нуклеопорин является последним сайтом связывания транспортного комплекса при экспорте из ядра [142], и его удаление из состава NPC приводит к полному ингибированию *Crml*-зависимого экспорта [143]. Так как никаких транспортных факторов, опосредующих импорт *Crml* в ядро, не обнаружено, можно полагать, что он перемещается за счет собственного средства к нуклеопоринам.

Транспорт в ядро экспортина *t* и других экспортинов изучен крайне слабо [131]. Можно спекулировать, что их транспорт в ядро также осуществляется без специальных посредников за счет собственного средства к нуклеопоринам цитоплазматической поверхности NPC. Установлено, что транспортировка экспортина *t* не требует гидролиза GTP/ATP [131].

HnRNP K содержит два NLS: cNLS и «KNS» (hnRNP K nuclear shuttling domain) [134]. За счет cNLS транспортировка может идти по классическому кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 механизму. KNS-зависимый транспорт имеет следующие специфические особенности: (1) KNS отвечает как за импорт, так и за экспорт HnRNP K. (2) Ядерный импорт зависит от активности РНК-полимеразы II. (3) Ядерный импорт не требует дополнительных факторов [134].

$Ca^{+2}$ -связывающий белок кальмодулин (CaM) может проникать в ядро за счет свободной диффузии, и его распределение между цитоплазмой и ядром могло бы зависеть лишь от уровня  $Ca^{+2}$  в цитоплазме и взаимодействия с CaM-связывающими белками. Однако, было показано, что транспортировка CaM в ядро может иметь активный характер и происходить при участии дополнительных факторов. Так, было обнаружено, что импорт CaM ингибируется WGA и при понижении температуры, что подтверждает транспорт через NPC, но процесс оказался энергонезависимым [137].

Установлен альтернативный механизм транспортировки белков с cNLS из цитоплазмы в ядро, который не зависит от Ran, но требует CaM. Так, при внутриклеточных концентрациях  $Ca^{+2}$ , ингибирующих классический ядерный транспорт, наблюдалось активирование альтернативного пути транспортировки cNLS-содержащих белков, которые узнаются CaM. Этот путь не зависит от гидролиза GTP, но требует ATP, ингибируется WGA и подавляется при понижении температуры [144].

Показано, что транспортировка белка NHR6A в ядро не требует гидролиза GTP и продолжается при понижении температуры, что свидетельствует в пользу Ran-независимого механизма транспорта [139].

В ответ на определенные стимулы киназа ERK переходит из цитоплазмы в ядро. По крайней мере, известны два возможных механизма ее транспортировки: пассивный, в виде мономера за счет свободной диффузии, и активный. На модельной системе с химерным белком GFP-ERK, который не может проникать в ядро за счет диффузии, было показано, что WGA, понижение температуры и избыток импортина- $\beta 1$  ингибировали переход ERK в ядро, однако никаких дополнительных факторов и затрат энергии для этого процесса не требовалось. Было обнаружено, что ERK напрямую взаимодействует с нуклеопорином Nup214, чем и может быть объяснен переход без помощи адаптерных белков [133].

Было показано, что кариоферин- $\alpha$  в ответ на различные стрессовые воздействия переходит в ядро, что ведет к ингибированию классического кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta 1$ /cNLS транспорта [135]. Эта транслокация кариоферина- $\alpha$  ингибировалась WGA, что свидетельствует в пользу активного транспорта через NPC. При этих же условиях другой модельный субстрат GST-NLS-GFP в ядро не перемещался. Эти данные свидетельствуют в пользу импортин- $\beta$ /Ran-независимого механизма.

Белки семейства STAT (signal transducers and activators of transcription) обычно переходят в ядро и обратно в цитоплазму по Ran-зависимому механизму [145]. Однако недавно было продемонстрировано, что переход может происходить Ran-независимо: в этом случае он не требует дополнительных переносчиков и энергонезависим [132]. Продемонстрировано, что Stat1 может напрямую взаимодействовать с FG-нуклеопоринами Nup153 и Nup214, но не с Nup62 [132].

Два близкородственных белка TIAR и TIA-1 содержат по три мотива RRM (RNA recognition motif). Причем установлено, что за транспорт этих белков в ядро отвечает мотив RRM2, за транспорт из ядра – RRM3. Транспортировка в ядро проходит по Ran-зависимому механизму, тогда как экспорт не зависит от гидролиза GTP на Ran [140].

Интересный Crm1-независимый экспорт был открыт для PKI и глюкокортикоидного рецептора. В качестве альтернативы Crm1 для перемещения этих белков выступает  $Ca^{+2}$ -связывающий белок кальретикулин (CRT) [126, 128]. Оказалось, что при понижении внутриклеточной концентрации  $Ca^{+2}$  CRT может связываться с NES глюкокортикоидного рецептора и в комплексе с RanGTP перемещаться в цитоплазму. То есть, этот механизм очень похож на классический ядерный Crm1-зависимый экспорт.

#### IV. РЕГУЛЯЦИЯ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ТРАНСПОРТА

Многостадийность переноса, наличие большого числа посредников, разнообразие сигналов транспортировки и многокомпонентное строение NPC подразумевает возможность регуляции ядерно-цитоплазматического распределения определенных белков в ответ на стимулы (ростовые, пролиферативные, дифференцировочные) или стадию клеточного цикла. С каждым годом появляется все больше работ по изучению регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта того или иного белка. Все множество частных примеров можно разбить на ограниченное число сходных механизмов регуляции [15, 146, 147]. В данном разделе на примере некоторых белков мы рассмотрим все известные на данный момент механизмы регуляции ядерного транспорта.

##### РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСПОРТА ЗА СЧЕТ МОДУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ИМПОРТИНА/ЭКСПОРТИНА С СИГНАЛОМ NLS/NES СУБСТРАТА

Основным фактором, определяющим ядерно-цитоплазматическое распределение белков, может быть регуляция на уровне формирования транспортных комплексов за счет модуляции взаимодействий импортин-NLS/экспортин-NES. Эти взаимодействия очень чувствительны к конформационным изменениям в областях NLS/NES и субстрат-связывающих сайтов кариоферин-связывающих сайтов. Подавляющее большинство известных примеров регуляции ядерно-цитоплазматического распределения затрагивает изменения в субстрате, модулирующие его NLS/NES [147]. Примеры сходной регуляции за счет изменений в кариоферинах крайне малочисленны.

##### *Маскирование сигналов NLS/NES субстрата от узнавания импортином/экспортином*

Маскирование NLS/NES сигналов является самым распространенным механизмом регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта.

**Внутримолекулярное маскирование сигналов NLS/NES субстрата.** Внутримолекулярное маскирование заключается в том, что при внесении заряда или конформационных изменений в NLS/NES-содержащую область белка доступ кариоферина к NLS/NES сигналу пропадает (рис. 6).

Субъединица p50 димерного транскрипционного фактора NF-κB (nuclear factor kappa B) синтезируется в виде предшественника p105, в котором NLS, узнаваемый комплексом кариоферин-α/импортин-β1, маскирован и недоступен. При иммунном ответе p105 специфично

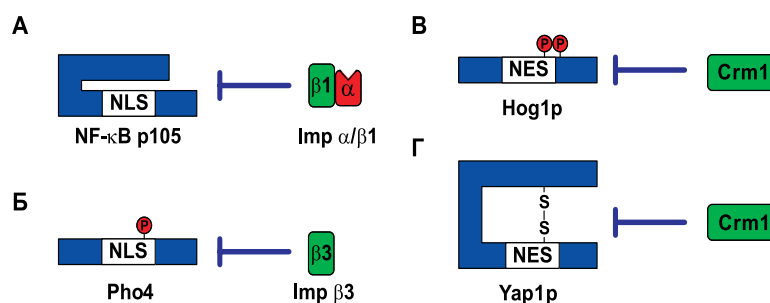


Рис. 6. Примеры внутримолекулярного маскирования (модифицирован из [147]).

А. В форме предшественника p105 сигнал ядерной локализации p50 субъединицы транскрипционного фактора NF-κB недоступен для связывания с комплексом карิโอферин-α/импортин-β1. Протеасомальная деградация С-концевой части предшественника p105 после его фосфорилирования демаскирует сигнал ядерной локализации (NLS) и приводит к транспорту в ядро.

Б. Фосфорилирование Pho4 по Ser152 маскирует NLS от узнавания импортином-β3. Ядерная транслокация наблюдается после дефосфорилирования этого остатка.

В. Фосфорилирование Hog1p по Thr174/Tyr176 маскирует сигнал ядерного экспорта (NES) от узнавания Crm1. Цитоплазматическая транслокация наблюдается после дефосфорилирования этих остатков.

Г. Окислительный стресс приводит к образованию дисульфидной связи в белке Yap1p. Формирование этой связи ингибирует связывание Crm1 с NES и приводит к накоплению белка в ядре.

Детали схемы подробно изложены в тексте.

фосфорилируется, и его С-концевая часть подвергается деградации. В результате такого процессинга до p50 NLS становится доступным для узнавания карิโอферин-α/импортином-β1, и NF-κB может перемещаться в ядро (рис. 6А) [148]. Сходный механизм показан для белка INI1 (integrator interactor 1) из комплекса SNF5 ремоделирования хроматина человека. С-конец этого белка маскирует NES, узнаваемый Crm1, и таким образом предотвращает его экспорт из ядра [149].

Внутримолекулярное маскирование может быть вызвано фосфорилированием в непосредственной близости от сигналов NLS/NES или внутри них. Белок NF-AT2 (nuclear factor of activated T cell 2) содержит два NLS, взаимодействие импортина с которыми зависит от фосфорилирования белка. При низком содержании  $Ca^{+2}$  в клетке фосфорилируются аминокислотные остатки в обоих сигналах, что приводит к ингибированию импорта NF-AT2 в ядро. При повышении концентрации  $Ca^{+2}$  фосфатаза кальциневрин дефосфорилирует сигналы, и NF-AT2 перемещается в ядро [150]. Аналогично, при высо-



ком содержании фосфатов в клетке циклин-зависимый киназный комплекс Pho80-Pho85 фосфорилирует фактор транскрипции Pho4 по Ser<sup>152</sup> вблизи NLS, что предотвращает взаимодействие с импортином- $\beta$ 3 (Kap121/Pse1) и, как следствие, запрещает переход фактора в ядро (рис. 6Б) [151].

Сходные механизмы обнаружены и для регуляции экспорта: в условиях осмотического стресса происходит фосфорилирование белка Hog1p (high osmolarity glycerol pathway-signaling protein) киназой Pbs2p по Thr<sup>174</sup> и Tyr<sup>176</sup>, что делает NES недоступным для связывания с экспортином 1 (Xpo1p) и приводит к ингибированию транспорта Hog1p из ядра (рис. 6В) [152].

К маскированию NLS/NES могут приводить конформационные изменения из-за образования дисульфидных связей между цистеиновыми остатками. Так, в условиях окислительного стресса у транскрипционного фактора Yap1p наблюдается формирование дисульфидной связи между Cys<sup>598</sup> и Cys<sup>620</sup>, что делает его NES недоступным для взаимодействия с экспортином Ctm1 (рис. 6Г) [153]. Сходный механизм регуляции перемещения показан и для транскрипционного фактора Pap1 [154].

**Межмолекулярное маскирование сигналов NLS/NES субстрата.** Межмолекулярное маскирование заключается в том, что к нарушению взаимодействий импортин-NLS/экспортер-NES приводит связывание NLS/NES-содержащего белка с другим белком или нуклеиновой кислотой (рис. 7).

При высоком содержании Ca<sup>+2</sup> кальциневрин (Ca<sup>+2</sup>-зависимая фосфатаза) связывается с транскрипционным фактором NF-AT4 и маскирует его NES от взаимодействия с Ctm1, что предотвращает экспорт фактора из ядра. При низком содержании Ca<sup>+2</sup> кальциневрин диссоциирует от NF-AT4 и демаскирует его NES (рис. 7А) [155].

Сходный механизм регуляции перехода в ядро показан для субъединицы p65 NF- $\kappa$ B: ее NLS маскируется от взаимодействия с комплексом кариоферин- $\alpha$ /импортер- $\beta$ 1 специфичным ингибитором I- $\kappa$ B [156]. При иммунном ответе I- $\kappa$ B фосфорилируется, что стимулирует его убиквитинирование и последующую деградацию под действием протеасомы. Это приводит к демаскированию сигнала NLS на p65 и переходу NF- $\kappa$ B в ядро (рис. 7Б) [157].

Подобно I- $\kappa$ B может функционировать BRCA1-связывающий белок BRAP2: он взаимодействует с NLS не только BRCA, но и с NLS большого T антигена вируса SV40 [158], однако влияние этих взаимодействий на импорт не было продемонстрировано, поэтому их роль в регуляции ядерного транспорта пока не ясна.

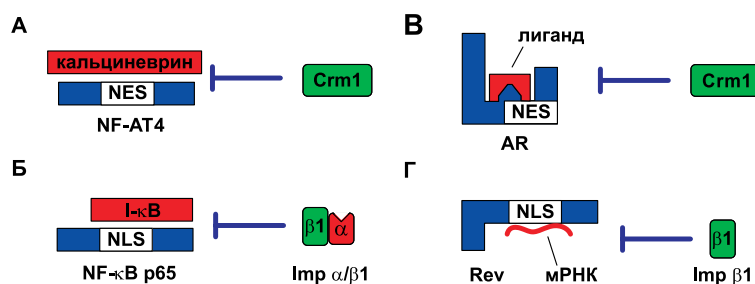


Рис. 7. Примеры межмолекулярного маскирования (модифицирован из [147]).

А. При высоком содержании  $\text{Ca}^{+2}$  кальциневрин связывается с NF-AT4 и маскирует его сигнал ядерного экспорта (NES) от взаимодействия с Crm1. Транслокация NF-AT4 в цитоплазму возможна лишь после диссоциации кальциневрина в ответ на понижение концентрации  $\text{Ca}^{+2}$ .

Б. Сигнал ядерной локализации (NLS) p65 субъединицы NF-κB маскируется от взаимодействия с комплексом кариоферин-α/импортин-β специфичным ингибитором I-κB. Демаскирование NLS сигнала на p65 и переход NF-κB в ядро возможны лишь после протеасомальной деградации I-κB.

В. NES рецептора андрогена (AR) лежит в лиганд-связывающем домене. В присутствии лиганда (андрогена) NES маскирован и не способен узнаваться Crm1. Перемещение AR в цитоплазму происходит лишь после диссоциации андрогена.

Г. Связывание аргинин-богатого мотива Rev с мРНК делает его NLS неспособным взаимодействовать с импортином-β1. Переход Rev в ядро возможен лишь после освобождения в цитоплазме от мРНК.

Детали схемы подробно изложены в тексте.

Ядерная локализация супрессора опухолей p53 регулируется несколькими механизмами. Один из них связан с фосфорилированием Ser<sup>15/20</sup> в p53, вызываемым повреждением ДНК. Это приводит к маскированию NES1. Другой механизм заключается в тетрамеризации белка p53 в ядре в ответ на повреждения ДНК: у тетрамерного p53 маскируются NES2. Диссоциация такого тетрамера необходима для экспорта белка из ядра [159].

Связывание лиганда также может приводить к маскированию NES/NLS, как было продемонстрировано для рецептора андрогена, у которого NES лежит в лиганд-связывающем домене [120]. В присутствии лиганда (андрогена) NES маскирован и не способен узнаваться Crm1. Перемещение рецептора происходит лишь после диссоциации андрогена (рис. 7В).

Межмолекулярное маскирование сигналов локализации может происходить при связывании белка с РНК или ДНК. Примером может служить белок Rev вируса HIV-1, который участвует в транс-

портировке мРНК HIV-1 из ядра в цитоплазму. При связывании мРНК с аргинин-богатым мотивом Rev, его NLS теряет способность взаимодействовать с импортином- $\beta 1$ . Переход Rev из цитоплазмы в ядро становится возможным лишь после освобождения в цитоплазме от перенесенной им мРНК (рис. 7Г) [160].

Транскрипционный фактор дрожжей GAL4 [161, 162] и человеческий фактор ремоделирования хроматина SRY содержат сигналы NLS, которые перекрываются с их ДНК-связывающими доменами. Понятно, что при попадании в ядро связывание с ДНК приводит к диссоциации белков из комплекса с импортином- $\beta 1$ . Физиологическое значение этого механизма может сводиться к Rap-независимому высвобождению транспортируемого белка в ядре в условиях, когда RapGTP лимитирован или когда активность Rap заингибирована цитозольным  $\text{Ca}^{+2}$  [163]. Таким же способом при связывании с ДНК STAT1 диссоциирует из комплекса с кариоферин- $\alpha$ /импортином- $\beta 1$  [164].

*Регуляция транспорта за счет усиления связывания импортина/экспортина с сигналом NLS/NES субстрата*

В отличие от маскирования NLS/NES, в результате которого нарушаются взаимодействия NLS с импортином и NES с экспортином, существуют примеры регуляции, когда связывание импортина/экспортина с NLS/NES усиливается (рис. 8).

Примером такой регуляции служит большой Т антиген вируса SV40: фосфорилирование киназой СК II по Ser<sup>111/112</sup>, фланкирующим сигналом NLS в Т антигене, усиливает сродство Т антигена к комплексу кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta 1$  в 100 раз и стимулирует его транспортировку в ядро в 50 раз [165]. Транспортировка в ядро морфогена *Drosophila* Dorsal сходным образом усиливается фосфорилированием по Ser<sup>312</sup>, расположенному вблизи N-концевой границы NLS. Такое фосфорилирование, катализируемое киназой PKA, приводит к увеличению сродства Dorsal к комплексу кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$  (рис. 8А) [166].

Фосфорилирование может сходным образом усиливать и ядерный экспорт. Фосфорилирование Pho4 по Ser<sup>114</sup> и Ser<sup>128</sup> увеличивает его сродство к экспортину 4 и стимулирует транспортировку из ядра (рис. 8Б) [39].

*Регуляция транспорта за счет удержания в цитоплазме или в ядре*

Другой механизм регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта реализуется через связывание NLS/NES-содержащего белка со специ-

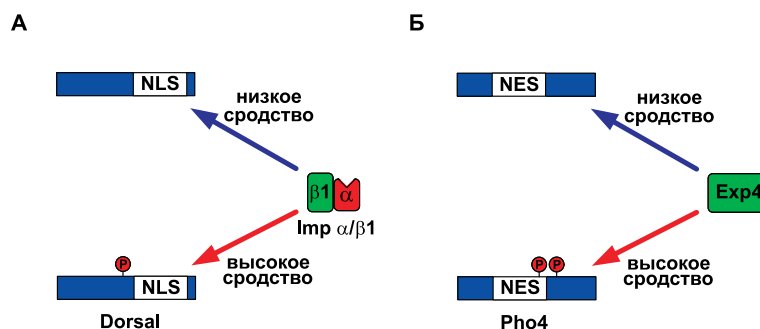


Рис. 8. Примеры усиления NLS/NES (модифицирован из [147]).

А. Фосфорилирование Dorsal по Ser312 в ответ на стимуляцию сигнальных путей усиливает сродство комплекса кариоферин- $\alpha$ /импортин- $\beta$ 1 к сигналу ядерной локализации (NLS) и стимулирует в несколько раз перемещение Dorsal в ядро.

Б. Фосфорилирование Pho по Ser114/128 усиливает RanGTP-зависимое взаимодействие сигнала ядерного экспорта (NES) с экспортином 4 и приводит к экспорту из ядра.

Детали схемы подробно изложены в тексте.

фичными цитоплазматическими или ядерными факторами, которые задерживают белки в цитоплазме или в ядре.

Глюкокортикоидный рецептор, к примеру, остается в цитоплазме из-за образования комплексов с Hsp90 в отсутствие лиганда. При связывании с гормоном глюкокортикоидный рецептор диссоциирует от Hsp90 и транспортируется в ядро по NLS-зависимому механизму [167]. Сходным образом супрессор опухолей p53 удерживается в цитоплазме белком Parc (Parkin-like ubiquitin ligase). Подавление экспрессии белка Parc в модельной системе при отсутствии стрессовых воздействий приводило к переходу p53 в ядро и активации p53-зависимого апоптоза [168].

Мультифункциональный ядерно-цитоплазматический ДНК/РНК-связывающий белок YB-1 содержит NLS приблизительно в середине молекулы. Ближе к С-концу в этом белке находится аминокислотная последовательность, которая отвечает за цитоплазматическую локализацию YB-1, – CRS (cytoplasmic retention site). CRS превалирует над сигналом NLS и удерживает белок в цитоплазме [169]. Было сделано предположение, что CRS обеспечивает цитоплазматическую локализацию YB-1 за счет взаимодействия с лигандом (мРНК/белки), который удерживает в цитоплазме. Но нельзя исключить, что CRS маскирует NLS от связывания с транспортными факторами. Было показано, что при ДНК-повреждающем стрессе в клетке под

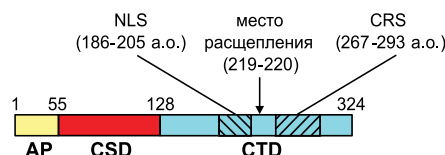


Рис. 9. Структурная организация и локализация сигнальных последовательностей YB-1 (модифицирован из [170]).

Домены YB-1: AP – N-концевой аланин/пролин богатый домен, CSD – домен холодового шока, CTD – С-концевой домен. Показаны сигнал ядерной локализации (NLS) и сигнал цитоплазматического удержания (CRS). Стрелкой указано место расщепления YB-1 20S протеасомой.

Детали схемы подробно изложены в тексте.

действием протеасомы происходит отщепление от YB-1 С-концевой части с сигналом удержания в цитоплазме, CRS, после чего укороченная форма белка транспортируется в ядро (рис. 9) [170]. Сходный процессинг и переход укороченного YB-1 в ядро наблюдался в эндотелиальных клетках, обработанных тромбином [171]. YB-1 связывается с кариоферином-β2, и этот комплекс разрушается в присутствии RanGTP [172]. Эти данные свидетельствуют в пользу классического Ran-зависимого транспорта YB-1 в ядро.

HIV-1 трансактиватор Tat [173], ангиогенин [174] и транскрипционный фактор IFI16 [175] – примеры белков, чей NLS-зависимый переход в ядро происходит без привлечения дополнительных факторов, и чье удержание в ядре происходит, по крайней мере отчасти, за счет взаимодействия сигналов NLS с компонентами ядра. В случае ангиогенина, который достаточно мал и способен переходить в ядро за счет диффузии, NLS не участвует во взаимодействии с импортинами, но участвует во взаимодействии с компонентами ядра, предотвращая диффузию в цитоплазму [174]. Ядерное или цитоплазматическое удержание может регулироваться фосфорилированием. Например, ядерное удержание IFI16 усиливается после фосфорилирования сигнала NLS киназой СК II [175]. NLS белка Tat тоже вовлекается во взаимодействие с ядерными компонентами, которое обеспечивает удержание Tat в ядре. Интересно, что NLS Tat также принимает участие в связывании Tat с цитоплазматическим фактором удержания, а разрушение такого комплекса (и последующий переход в ядро) требует гидролиза ATP и GTP [173].

Ясно, что взаимодействие с факторами удержания в ядре или в цитоплазме играет большую роль в регуляции ядерно-цитоплазматического распределения белков в ответ на стимуляцию различных сигнальных путей клетки.

*Регуляция транспорта за счет котранспортировки и изменения субстрат-связывающих свойств кариоферина*

Как уже упоминалось выше, разные кариоферины вовлечены в импорт или экспорт белков, и лишь некоторые работают в обоих направлениях [13, 20, 176]. Немногочисленное семейство кариоферинов обеспечивает транспортировку, по крайней мере, 1500 белков. Это свидетельствует о том, что каждый кариоферин способен связывать большое количество различных субстратов. На сегодняшний день наличие специфичных пар субстрат-кариоферин известно приблизительно лишь для 40 субстратов, более того, не все сигналы NLS/NES известны или точно идентифицированы [13, 20, 176]. Для некоторых белков показано, что они транспортируются в комплексе с другими белками. Такой комплекс формируется сразу после синтеза белка, до его связывания с кариоферинем [21, 22, 25, 177–179]. Возможно также одновременное связывание кариоферинов с несколькими разными субстратами, что может говорить о котранспортировке их одним кариоферинем.

Регуляция клеточных процессов иногда требует точного соотношения белков или одновременной их доставки в определенное место ядра или цитоплазмы. Такая координированная регуляция транспортировки может достигаться за счет одновременного перехода на одном и том же кариоферине двух или более разных белков. Транспортировка такого типа описана для гистонов H2A, H2B и их шаперона Nap1p с помощью кариоферина Kap114p [21, 22]. Установлено, что кариоферин Kap114p содержит перекрывающиеся субстрат-связывающие сайты для четырех разных субстратов: гистонов H2A и H2B, Sua7p и Nap1p, а также для партнеров по транспортировке – RanGTP и нуклеопоринов [180]. Поскольку комплексы кариоферина Kap114p одновременно с гистонами H2A/H2B и Sua7p получить не удавалось, авторы предположили, что эти белки имеют перекрывающиеся сайты связывания на кариоферине. С другой стороны, Sua7p способен связываться с кариоферинем одновременно с Nap1p. Значит, их сайты не перекрываются. Вместе с тем, удалось получить стабильные комплексы Kap114p одновременно с гистонами H2A/H2B и Sua7p в присутствии Kap114p/Nap1p/Sua7p в качестве заправки для сборки. Предполагается, что гистоны H2A/H2B могут вовлекаться в комплекс за счет взаимодействия с Nap1p [180]. Не исключено, что из-за определенных конформационных перестроек кариоферина при связывании одного субстрата, может формироваться другой субстрат-связывающий сайт, возможно, с участием первого субстрата.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСПОРТА ЗА СЧЕТ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА  
ИМПОРТИНОВ И ЭКСПОРТИНОВ

Изобилие различных факторов, узнающих сигнальные последовательности на транспортируемых белках (табл. 1), свидетельствует в пользу того, что транспорт определенных клеточных белков может избирательно регулироваться на этом уровне. Так как факторы имеют разную субстратную специфичность, логично предположить, что транспорт определенных белков может регулироваться за счет изменения уровня экспрессии соответствующего транспортного фактора (импортина или экспортина).

Анализ уровня мРНК кариоферин- $\alpha$  в различных тканях показал, что экспрессия генов кариоферин- $\alpha$  может быть тканеспецифичной: уровень мРНК импортина- $\alpha 1$  был невысоким в различных тканях, тогда как мРНК импортинов- $\alpha 4$ , - $\alpha 5$  и - $\alpha 6$  было очень много в семенниках и чуть меньше в селезенке [181, 182]. Анализ количества белков подтвердил данные о тканеспецифичности кариоферин- $\alpha$ . Так, человеческий импортин- $\alpha 4$ , количество которого составляет более 1% от белков в скелетных мышцах, практически отсутствует в сердце, селезенке и почках [183]. Импортин- $\alpha 2$  много в сердце, семенниках, скелетных мышцах и яичниках, а импортин- $\alpha 3$  больше всего обнаружено в яичниках [184]. Недавно было продемонстрировано, что белок dHSF (*Drosophila* heat-shock factor), специфично переносимый импортин- $\alpha 3$ , транспортируется в ядро только на поздних стадиях развития, когда начинает экспрессироваться импортин- $\alpha 3$  [185].

Относительно немного известно о кариоферинах- $\beta$ . Было показано, что уровень мРНК Crm1 [186], транспортин 1 [187] и импортин- $\alpha 3$  [188] практически не изменялся в разных тканях в ходе развития *Drosophila*, тогда как мРНК CAS обнаруживалась в разных тканях лишь на определенных стадиях развития [189].

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСПОРТА ЗА СЧЕТ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА  
НУКЛЕОПОРИНОВ

Несмотря на то, что NPC не содержит никаких моторных белков и, по-существу, является пассивным участником транспорта, его состав может изменяться. Известно, что нуклеопорины проявляют разную специфичность (аффинность) к разным импортинам и экспортинам [190]. Это позволяет думать, что изменение экспрессии того или иного нуклеопорина может модулировать эффективность транспортировки определенных белков через NPC. К примеру, в клетках, дефицитных по нуклеопорину Nup98, селективно ухудшается транспорт белков, содержащих классические NLS, но не рибосомального белка L23a [191].

Были также описаны тканеспецифичные различия в NPC. Так, содержание в NPC белка Nprp60, который облегчает транспортировку определенных факторов и комплексов в ядро, в семенниках оказалось на порядок выше, чем в других тканях [192]. Нуклеопорин Nup BS-63 (сплайсинг-изоформа Nup358) также обнаружен только в семенниках. Причем показано, что он может напрямую взаимодействовать с Ran, импортином- $\beta 2$  и фактором ремоделирования хроматина aF10. aF10-подобные факторы могут проникать в ядро за счет прямого взаимодействия с нуклеопорином Nup BS-63 [193]. Функциональная важность индивидуальных нуклеопоринов продемонстрирована и на Nup154 *Drosophila* (гомолог Nup155) – в его отсутствие нарушалось нормальное развитие гамет [194].

Интересным оказался результат, полученный *in vitro*: при снижении концентрации  $Ca^{+2}$  существенно затруднялся транспорт белков в ядро даже за счет диффузии. По-видимому, снижение концентрации  $Ca^{+2}$  приводит к конформационным изменениям в NPC, что и может вызывать затруднения в транспортировке [195]. Этот эффект, по всей вероятности, обусловлен конформационными изменениями в большом полостном нуклеопорине gp210, который содержит несколько  $Ca^{+2}$ -связывающих доменов [196].

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первые свидетельства, указывающие на возможность перемещения белков между цитоплазмой и ядром, были получены в 1950-х годах [197]. Спустя еще около 30 лет был идентифицирован первый «белок-челнок» – нуклеолин [198]. За последние годы произошел настоящий прорыв в изучении ядерно-цитоплазматического транспорта. Все началось с открытия ГТРаза Ran в 1993 году [61, 62], после чего последовало лавинообразное обнаружение многих других факторов, участвующих в ядерно-цитоплазматическом транспорте. На сегодняшний день известно большинство ключевых компонентов этого процесса, что позволило построить общую «грубую» модель ядерно-цитоплазматического транспорта (рис. 4). Нужно понимать, что ядерно-цитоплазматический транспорт – одна из наиболее динамично развивающихся областей клеточной и молекулярной биологии, поэтому представленная модель транспорта далеко не полная и не единственная. Каждый год появляются данные как о новых участниках «классического» Ran-зависимого транспорта, так и свидетельства в пользу того, что транспортировка может идти по альтернативным механизмам.



К настоящему времени список белков, перемещающихся между цитоплазмой и ядром, включает транспортные рецепторы и адаптеры, рецепторы стероидных гормонов, факторы транскрипции, регуляторы клеточного цикла и множество РНК-связывающих белков [5, 199–204]. Создается впечатление, что именно такие ядерно-цитоплазматические «белки-челноки» являются ключевыми звеньями в передаче информации между двумя основными компартментами клетки. Для нормального функционирования клетки ядерно-цитоплазматическое распределение таких белков нуждается в постоянной регуляции и координации. Все чаще среди причин ракового перерождения клеток находят нарушения в распределении между ядром и цитоплазмой тех или иных белков [147]. Этим можно объяснить то внимание, которое в последние годы уделяется исследованию ядерно-цитоплазматического транспорта, в том числе поиску альтернативных механизмов транспорта и детальному изучению уже известных механизмов регуляции перераспределения белков между цитоплазмой и ядром.

В этом обзоре мы постарались осветить основные аспекты ядерно-цитоплазматического транспорта белков (строение порового комплекса, сигналы ядерной локализации белков и сигналы экспорта из ядра, модель классического Ran-зависимого механизма транспорта), а также привлечь внимание читателей к существованию альтернативных механизмов транспорта, и систематизировать основные механизмы регуляции транспорта белков.

Авторы выражают искреннюю благодарность Е.В. Серебровой за помощь в написании данной статьи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rout, M.P., Aitchison, J.D. (2000) *Essays Biochem.*, **36**, 75–88.
2. Franke, W.W., Scheer, U. (1974) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 249–282.
3. King, M.C., Lusk, C.P., Blobel, G. (2006) *Nature*, **442**, 1003–1007.
4. Suntharalingam, M., Wenthe, S.R. (2003) *Dev. Cell*, **4**, 775–789.
5. Gorlich, D., Kutay, U. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 607–660.
6. Keminer, O., Peters, R. (1999) *Bio-phys. J.*, **77**, 217–228.
7. Paine, P.L., Moore, L.C., Horowitz, S.B. (1975) *Nature*, **254**, 109–114.
8. Pante, N., Kann, M. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 425–434.
9. Kiseleva, E.V., Goldberg, M.W., Allen, T.D., Akey, C.W. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 223–236.
10. Ribbeck, K., Gorlich, D. (2001) *EMBO J.*, **20**, 1320–1330.
11. Siebrasse, J.P., Peters, R. (2002) *EMBO Rep.*, **3**, 887–892.
12. Breeuwer, M., Goldfarb, D.S. (1990) *Cell*, **60**, 999–1008.

13. *Mosammaparast, N., Pemberton, L.F.* (2004) *Trends Cell Biol.*, **14**, 547–556.
14. *Pemberton, L.F., Paschal, B.M.* (2005) *Traffic*, **6**, 187–198.
15. *Jans, D.A., Xiao, C.Y., Lam, M.H.* (2000) *Bioessays*, **22**, 532–544.
16. *Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., Adam, S.A.* (2004) *Trends Cell Biol.*, **14**, 505–514.
17. *Hall, M.N., Craik, C., Hiraoka, Y.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6954–6958.
18. *Makkerh, J.P., Dingwall, C., Laskey, R.A.* (1996) *Curr. Biol.*, **6**, 1025–1027.
19. *Fried, H., Kutay, U.* (2003) *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 1659–1688.
20. *Weis, K.* (2003) *Cell*, **112**, 441–451.
21. *Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 862–868.
22. *Mosammaparast, N., Jackson, K.R., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F.* (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 251–262.
23. *Muhlhauser, P., Muller, E.C., Otto, A., Kutay, U.* (2001) *EMBO Rep.*, **2**, 690–696.
24. *Jakel, S., Gorlich, D.* (1998) *EMBO J.*, **17**, 4491–4502.
25. *Leslie, D.M., Zhang, W., Timney, B.L., Chait, B.T., Rout, M.P., Wozniak, R.W., Aitchison, J.D.* (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 8487–8503.
26. *Senger, B., Simos, G., Bischoff, F.R., Podtelejnikov, A., Mann, M., Hurt, E.* (1998) *Embo J.*, **17**, 2196–2207.
27. *Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F., Dreyfuss, G.* (1996) *Cell*, **86**, 985–994.
28. *Rosenblum, J.S., Pemberton, L.F., Bonifaci, N., Blobel, G.* (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 887–899.
29. *Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., Muller, C.W.* (1999) *Nature*, **399**, 221–229.
30. *Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M.T., Gerace, L.* (2002) *Mol. Cell*, **10**, 1345–1353.
31. *Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K.T., Tsukihara, T., Yoneda, Y.* (2003) *Science*, **302**, 1571–1575.
32. *Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., Luhrmann, R.* (1995) *Cell*, **82**, 475–483.
33. *la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F.M., Brunak, S.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 393–396.
34. *Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S.* (1995) *Cell*, **82**, 463–473.
35. *Johnson, A.W., Lund, E., Dahlberg, J.* (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 580–585.
36. *Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., Mattaj, I.W.* (2000) *Cell*, **101**, 187–198.
37. *Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R., Gorlich, D.* (1999) *J. Cell Biol.*, **145**, 255–264.
38. *Hood, J.K., Silver, P.A.* (1999) *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 241–247.
39. *Komeili, A., O'Shea, E.K.* (1999) *Science*, **284**, 977–980.
40. *Kaffman, A., O'Shea, E.K.* (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 291–339.
41. *Lei, E.P., Silver, P.A.* (2002) *Dev. Cell*, **2**, 261–272.
42. *Kim, V.N.* (2004) *Trends Cell Biol.*, **14**, 156–159.
43. *Zeng, Y., Cullen, B.R.* (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4776–4785.
44. *Akey, C.W., Radermacher, M.* (1993) *J. Cell Biol.*, **122**, 1–19.

45. Hinshaw, J.E., Carragher, B.O., Milligan, R.A. (1992) *Cell*, **69**, 1133–1141.
46. Stoffler, D., Fahrenkrog, B., Aebi, U. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 391–401.
47. Yang, Q., Rout, M.P., Akey, C.W. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 223–234.
48. Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., Matunis, M.J. (2002) *J. Cell Biol.*, **158**, 915–927.
49. Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jr., Jarnik, M., Engel, A., Aebi, U. (1990) *J. Cell Biol.*, **110**, 883–894.
50. Marelli, M., Dilworth, D.J., Wozniak, R.W., Aitchison, J.D. (2001) *Biochem. Cell Biol.*, **79**, 603–612.
51. Rout, M.P., Aitchison, J.D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 16593–16596.
52. Devos, D., Dokudovskaya, S., Alber, F., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., Rout, M.P. (2004) *PLoS Biol.*, **2**, e380.
53. Weirich, C.S., Erzberger, J.P., Berger, J.M., Weis, K. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 749–760.
54. Ben-Efraim, I., Gerace, L. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 411–417.
55. Pyhtila, B., Rexach, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 42699–42709.
56. Shah, S., Forbes, D.J. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 1376–1386.
57. Shah, S., Tugendreich, S., Forbes, D. (1998) *J. Cell Biol.*, **141**, 31–49.
58. Peters, R. (2005) *Traffic*, **6**, 421–427.
59. Corbett, A.H., Koepf, D.M., Schlenstedt, G., Lee, M.S., Hopper, A.K., Silver, P.A. (1995) *J. Cell Biol.*, **130**, 1017–1026.
60. Schlenstedt, G., Wong, D.H., Koepf, D.M., Silver, P.A. (1995) *EMBO J.*, **14**, 5367–5378.
61. Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., Gerace, L. (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 1649–1659.
62. Moore, M.S., Blobel, G. (1993) *Nature*, **365**, 661–663.
63. Stochaj, U., Rother, K.L. (1999) *Bioessays*, **21**, 579–589.
64. Moore, M.S. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 22857–22860.
65. Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F. (1991) *Nature*, **349**, 117–127.
66. Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., Ponstingl, H. (1995) *EMBO J.*, **14**, 705–715.
67. Hopper, A.K., Traglia, H.M., Dunst, R.W. (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 309–321.
68. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., Melchior, F. (1997) *Cell*, **88**, 97–107.
69. Kunzler, M., Gerstberger, T., Stutz, F., Bischoff, F.R., Hurt, E. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 4295–4308.
70. Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D., Macara, I.G. (2001) *Science*, **292**, 1540–1543.
71. Bischoff, F.R., Ponstingl, H. (1991) *Nature*, **354**, 80–82.
72. Welch, K., Franke, J., Kohler, M., Macara, I.G. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 8400–8411.
73. Nemergut, M.E., Lindsay, M.E., Brownawell, A.M., Macara, I.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 17385–17388.
74. Adam, E.J., Adam, S.A. (1994) *J. Cell Biol.*, **125**, 547–555.
75. Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A., Hartmann, E. (1994) *Cell*, **79**, 767–778.
76. Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A.D., Hartmann, E., Laskey, R.A. (1995) *Nature*, **377**, 246–248.
77. Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E., Prehn, S. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 383–392.
78. Wu, J., Matunis, M.J., Kraemer, D., Blobel, G., Coutavas, E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 14209–14213.

79. Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U., et al. (1995) *Nature*, **376**, 184–188.
80. Delphin, C., Guan, T., Melchior, F., Gerace, L. (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2379–2390.
81. Floer, M., Blobel, G. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 5313–5516.
82. Lounsbury, K.M., Macara, I.G. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 551–555.
83. Oki, M., Nishimoto, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 32894–32900.
84. Pante, N., Aebi, U. (1996) *Science*, **273**, 1729–1732.
85. Moore, M.S., Blobel, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10212–10216.
86. Nehrbass, U., Blobel, G. (1996) *Science*, **272**, 120–122.
87. Paschal, B.M., Gerace, L. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 925–937.
88. Stewart, M., Kent, H.M., McCoy, A.J. (1998) *J. Mol. Biol.*, **277**, 635–646.
89. Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., Bischoff, F.R. (1996) *EMBO J.*, **15**, 5584–5594.
90. Rexach, M., Blobel, G. (1995) *Cell*, **83**, 683–692.
91. Chi, N.C., Adam, E.J., Adam, S.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 6818–6822.
92. Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., Gorlich, D. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3685–3694.
93. Hood, J.K., Silver, P.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 35142–35146.
94. Kunzler, M., Hurt, E.C. (1998) *FEBS Lett.*, **433**, 185–190.
95. Lindsay, M.E., Holaska, J.M., Welch, K., Paschal, B.M., Macara, I.G. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 1391–1402.
96. Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A., Ponstingl, H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2587–2591.
97. Dingwall, C., Kandels-Lewis, S., Seraphin, B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7525–7529.
98. Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., Izaurralde, E. (1997) *J. Cell Biol.*, **138**, 65–80.
99. Hartmann, E., Gorlich, D. (1995) *Trends Cell Biol.*, **5**, 192–193.
100. Mueller, L., Cordes, V.C., Bischoff, F.R., Ponstingl, H. (1998) *FEBS Lett.*, **427**, 330–336.
101. Deane, R., Schafer, W., Zimmermann, H.P., Mueller, L., Gorlich, D., Prehn, S., Ponstingl, H., Bischoff, F.R. (1997) *Mol Cell Biol*, **17**, 5087–5096.
102. Macara, I.G. (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 570–594.
103. Soullam, B., Worman, H.J. (1995) *J. Cell Biol.*, **130**, 15–27.
104. Kutay, U., Muhlhauser, P. (2006) *Nature*, **442**, 991–992.
105. Ohba, T., Schirmer, E.C., Nishimoto, T., Gerace, L. (2004) *J. Cell Biol.*, **167**, 1051–1062.
106. Horton, P., Nakai, K. (1997) *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, **5**, 147–152.
107. Shulga, N., Goldfarb, D.S. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 534–542.
108. Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., Yamamoto, K. R. (1990) *Cell Regul.*, **1**, 291–299.
109. Picard, D., Yamamoto, K.R. (1987) *EMBO J.*, **6**, 3333–3340.
110. Poukka, H., Karvonen, U., Yoshikawa, N., Tanaka, H., Palvimo, J.J., Janne, O.A. (2000) *J. Cell Sci.*, **113** (Pt 17), 2991–3001.

111. Savory, J.G., Hsu, B., Laquian, I.R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R.J., Lefebvre, Y.A. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1025–1037.
112. Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S., Wilson, E.M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 510–518.
113. Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H., Chambon, P. (1992) *EMBO J.*, **11**, 3681–3694.
114. Zhou, Z.X., Sar, M., Simental, J.A., Lane, M.V., Wilson, E.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 13115–1323.
115. Freedman, N.D., Yamamoto, K.R. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2276–2286.
116. Davies, T.H., Ning, Y.M., Sanchez, E.R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 4597–4600.
117. Pratt, W.B., Toft, D.O. (1997) *Endocr. Rev.*, **18**, 306–360.
118. Shank, L.C., Paschal, B.M. (2005) *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.*, **15**, 49–73.
119. Black, B.E., Holaska, J.M., Rastinejad, F., Paschal, B.M. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1749–1758.
120. Saporita, A.J., Zhang, Q., Navai, N., Dincer, Z., Hahn, J., Cai, X., Wang, Z. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 41998–42005.
121. Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Ozato, K., Guroff, G. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 435–440.
122. Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H., Imai, K. (2002) *Mol. Endocrinol.*, **16**, 2382–2392.
123. Liu, J., DeFranco, D.B. (2000) *Mol. Endocrinol.*, **14**, 40–51.
124. Amazit, L., Alj, Y., Tyagi, R.K., Chauchereau, A., Loosfelt, H., Pichon, C., Pantel, J., Foulon-Guinard, E., Leclerc, P., Milgrom, E., Guiochon-Mantel, A. (2003) *J Biol Chem*, **278**, 32195–32203.
125. Kino, T., Souvatzoglou, E., De Martino, M.U., Tsopanomihalu, M., Wan, Y., Chrousos, G.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 25651–25656.
126. Holaska, J.M., Black, B.E., Rastinejad, F., Paschal, B.M. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6286–6297.
127. Fagotto, F., Gluck, U., Gumbiner, B.M. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 181–190.
128. Holaska, J.M., Black, B.E., Love, D.C., Hanover, J.A., Leszyk, J., Paschal, B.M. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 127–140.
129. Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A., Gerace, L. (1998) *J. Cell Biol.*, **141**, 863–874.
130. Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Shimamoto, T., Yoneda, Y. (1997) *J. Cell Biol.*, **139**, 841–849.
131. Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., Gorlich, D. (1998) *Mol. Cell.*, **1**, 359–369.
132. Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., Vinkemeier, U. (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 823–833.
133. Matsubayashi, Y., Fukuda, M., Nishida, E. (2001) *J. Biol Chem.*, **276**, 41755–41760.
134. Michael, W.M., Eder, P.S., Dreyfuss, G. (1997) *EMBO J.*, **16**, 3587–3598.
135. Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., Yoneda, Y. (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 617–623.
136. Nakielny, S., Dreyfuss, G. (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 89–95.
137. Pruschy, M., Ju, Y., Spitz, L., Carafole, E., Goldfarb, D.S. (1994) *J. Cell Biol.*, **127**, 1527–1536.
138. Schmalz, D., Hucho, F., Buchner, K. (1998) *J. Cell Sci.*, **111 (Pt 13)**, 1823–1830.

139. Yen, Y.M., Roberts, P.M., Johnson, R.C. (2001) *Traffic*, **2**, 449–464.
140. Zhang, T., Delestienne, N., Huez, G., Kruijs, V., Gueydan, C. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 5453–5463.
141. Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K.G., Franssen, J., Grosveld, G. (1997) *EMBO J.*, **16**, 807–816.
142. Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T., Gerace, L. (1999) *J. Cell Biol.*, **145**, 645–657.
143. Hutten, S., Kehlenbach, R.H. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 6772–6785.
144. Sweitzer, T.D., Hanover, J.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14574–14579.
145. Meyer, T., Vinkemeier, U. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4606–4612.
146. Hogarth, C., Itman, C., Jans, D.A., Loveland, K.L. (2005) *Bioessays*, **27**, 1011–1025.
147. Poon, I.K., Jans, D.A. (2005) *Traffic*, **6**, 173–186.
148. Riviere, Y., Blank, V., Kourilsky, P., Israel, A. (1991) *Nature*, **350**, 625–626.
149. Craig, E., Zhang, Z.K., Davies, K.P., Kalpana, G.V. (2002) *EMBO J.*, **21**, 31–42.
150. Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., Crabtree, G.R. (1997) *Science*, **275**, 1930–1934.
151. Kaffman, A., Rank, N.M., O'Shea, E.K. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 2673–2683.
152. Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., Silver, P.A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5606–5614.
153. Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., Nomoto, A. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 6139–6150.
154. Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., Horinouchi, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 15151–15158.
155. Zhu, J., McKeon, F. (1999) *Nature*, **398**, 256–260.
156. Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., Baldwin, A.S., Jr. (1992) *Genes Dev.*, **6**, 1899–1913.
157. Traenckner, E.B., Wilk, S., Baeuerle, P.A. (1994) *EMBO J.*, **13**, 5433–5441.
158. Li, S., Ku, C.Y., Farmer, A.A., Cong, Y.S., Chen, C.F., Lee, W.H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6183–6189.
159. Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., Wahl, G.M. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1660–1672.
160. Fineberg, K., Fineberg, T., Graessmann, A., Luedtke, N.W., Tor, Y., Lixin, R., Jans, D.A., Loyter, A. (2003) *Biochemistry*, **42**, 2625–2633.
161. Chan, C.K., Jans, D.A. (1999) *FEBS Lett.*, **462**, 221–224.
162. Chan, C.K., Jans, D.A. (2001) *Gene Ther.*, **8**, 166–171.
163. Argentaro, A., Sim, H., Kelly, S., Preiss, S., Clayton, A., Jans, D.A., Harley, V.R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 33839–33847.
164. McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N.C. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1754–1763.
165. Hubner, S., Xiao, C.Y., Jans, D.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 17191–17195.
166. Briggs, L.J., Stein, D., Goltz, J., Corrigan, V.C., Efthymiadis, A., Hubner, S., Jans, D.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 22745–22752.
167. Tago, K., Tsukahara, F., Naruse, M., Yoshioka, T., Takano, K. (2004) *Mol. Cell Endocrinol.*, **213**, 131–138.

168. Nikolaev, A.Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J., Gu, W. (2003) *Cell*, **112**, 29–40.
169. Bader, A.G., Vogt, P.K. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 2095–2106.
170. Sorokin, A.V., Selyutina, A.A., Skabkin, M.A., Guryanov, S.G., Nazimov, I.V., Richard, C., Th'ng, J., Yau, J., Sorensen, P.H., Ovchinnikov, L.P., Evdokimova, V. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3602–3612.
171. Stenina, O.I., Poptic, E.J., DiCorleto, P.E. (2000) *J. Clin. Invest.*, **106**, 579–587.
172. Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., Chook, Y.M. (2006) *Cell*, **126**, 543–558.
173. Efthymiadis, A., Briggs, L.J., Jans, D.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 1623–1628.
174. Lixin, R., Efthymiadis, A., Henderson, B., Jans, D.A. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 185–193.
175. Briggs, L.J., Johnstone, R.W., Elliot, R.M., Xiao, C.Y., Dawson, M., Trapani, J.A., Jans, D.A. (2001) *Biochem. J.*, **353**, 69–77.
176. Harel, A., Forbes, D.J. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 319–330.
177. Mosammaparast, N., Ewart, C.S., Pemberton, L.F. (2002) *EMBO J.*, **21**, 6527–6538.
178. Titov, A.A., Blobel, G. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 235–246.
179. Yoshida, K., Blobel, G. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 729–740.
180. Hodges, J.L., Leslie, J.H., Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 3200–3210.
181. Nadler, S.G., Tritschler, D., Haffar, O.K., Blake, J., Bruce, A.G., Cleveland, J.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4310–4315.
182. Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N., Yoneda, Y. (1997) *FEBS Lett.*, **416**, 30–34.
183. Nachury, M.V., Ryder, U.W., Lamond, A.I., Weis, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 582–587.
184. Kohler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H., Hartmann, E. (1997) *FEBS Lett.*, **417**, 104–108.
185. Fang, X., Chen, T., Tran, K., Parker, C.S. (2001) *Development*, **128**, 3349–3358.
186. Collier, S., Chan, H.Y., Toda, T., McKimmie, C., Johnson, G., Adler, P.N., O'Kane, C., Ashburner, M. (2000) *Genetics*, **155**, 1799–1807.
187. Norvell, A., Kelley, R.L., Wehr, K., Schupbach, T. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 864–876.
188. Mathe, E., Bates, H., Huikeshoven, H., Deak, P., Glover, D.M., Cotterill, S. (2000) *Dev Biol*, **223**, 307–322.
189. Tekotte, H., Berdnik, D., Torok, T., Buszczak, M., Jones, L.M., Cooley, L., Knoblich, J.A., Davis, I. (2002) *Dev. Biol.*, **244**, 396–406.
190. Allen, N.P., Huang, L., Burlingame, A., Rexach, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 29268–29274.
191. Wu, X., Kasper, L.H., Mantcheva, R.T., Mantchev, G.T., Springett, M.J., van Deursen, J.M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3191–3196.
192. Fan, F., Liu, C.P., Korobova, O., Heyting, C., Offenberger, H.H., Trump, G., Arnheim, N. (1997) *Genomics*, **40**, 444–453.
193. Cai, Y., Gao, Y., Sheng, Q., Miao, S., Cui, X., Wang, L., Zong, S., Koide, S.S. (2002) *Mol. Reprod. Dev.*, **61**, 126–134.

- 
194. Gigliotti, S., Callaini, G., Andone, S., Riparbelli, M.G., Pernas-Alonso, R., Hoffmann, G., Graziani, F., Malva, C. (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 1195–1207.
195. Perez-Terzic, C., Jaconi, M., Clapham, D.E. (1997) *Bioessays*, **19**, 787–792.
196. Perez-Terzic, C., Pyle, J., Jaconi, M., Stehno-Bittel, L., Clapham, D.E. (1996) *Science*, **273**, 1875–1877.
197. Goldstein, L. (1958) *Exp. Cell Res.*, **15**, 635–637.
198. Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., Nigg, E.A. (1989) *Cell*, **56**, 379–390.
199. Hache, R.J., Tse, R., Reich, T., Savory, J.G., Lefebvre, Y.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 1432–1439.
200. Cartwright, P., Helin, K. (2000) *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 1193–1206.
201. Pines, J. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 73–79.
202. Yang, J., Kornbluth, S. (1999) *Trends Cell Biol.*, **9**, 207–210.
203. Nakielny, S., Dreyfuss, G. (1999) *Cell*, **99**, 677–690.
204. Shyu, A.B., Wilkinson, M.F. (2000) *Cell*, **102**, 135–138.