

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ. ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ.

© 2004 г. А. А. МИНИН, А. В. КУЛИК

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Цитоскелет, как средство внутриклеточного транспорта. III. Многообразие моторных белков. IV. Регуляция моторных белков. V. Регуляция свойств цитоскелетных структур. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариот транспорт и локализация органелл, мембранных везикул, надмолекулярных комплексов, а также отдельных молекул осуществляется вдоль микротрубочек и актиновых микрофиламентов, образующих в них так называемый цитоскелет. Транспорт вдоль структур цитоскелета происходит при помощи специализированных механохимических АТФаз, называемых моторными белками. Моторные белки, связанные с микротрубочками, относятся к двум большим семействам — кинезинам [201] и динеинам [74,177], а с актиновыми микрофиламентами — к миозинам. Движение отдельных органелл как правило является результатом действия нескольких моторных белков, и правильность транспорта обеспечивается тонкой

Принятые сокращения: СКП — казеиновая киназа II; CyDn — цитоплазматический динеин; ДНС — тяжелая цепь динеина (dynein heavy chain); КАР — белок, ассоциированный с кинезином; КНС — тяжелая цепь кинезина (kinesin heavy chain); КЛС — легкая цепь кинезина (kinesin light chain); KIF2 — один из членов семейства кинезинов; Klp — белок, похожий на кинезин (kinesin-like protein); KRP — белок, имеющий отношение к кинезину (kinesin-related protein); MAP — белок, ассоциированный с микротрубочками (microtubule-associated protein); МНС — тяжелая цепь миозина (myosin heavy chain); МНСК — протеинкиназа тяжелой цепи миозина (myosin heavy chain kinase); PAK — белок, ассоциированный с p21; PKA — протеинкиназа A; Ras, Rho, Rab, Arf и Ran, Rac и Cdc42 — обозначения различных низкомолекулярных ГТФ-связывающих белков; ЭР — эндоплазматический ретикулум.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Академии наук и РФФИ № 02–04–48548.

Адрес для корреспонденции: e-mail: minin@eimb.ru

регуляцией их активности [157]. К настоящему времени в литературе накоплено немного примеров хорошо изученной регуляции моторных белков и транспорта органелл в целом, однако уже сейчас можно выделить некоторые общие черты такой регуляции. В настоящем обзоре суммированы последние данные, полученные в этой области, и сделана попытка проанализировать некоторые общие принципы регуляции внутриклеточного транспорта.

I. ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СРЕДСТВО ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА

Для клеток высших эукариот характерной чертой является цитоскелет, состоящий из трех основных компонентов: микротрубочек, актиновых микрофиламентов и промежуточных филаментов. Все они представляют собой полимерные фибриллы, построенные из глобулярных белков и взаимодействующие между собой и с другими клеточными структурами, что сообщает цитоплазме механическую прочность и эластичность. В процессах внутриклеточной подвижности непосредственно участвуют два первых цитоскелетных компонента, поэтому мы подробнее остановимся на их свойствах.

Необходимость развитой фибриллярной системы, представляющую собой цитоскелет в клетках эукариот, для внутриклеточного транспорта очевидно связана с их относительно большими размерами. Если бы в клетках животных, имеющих размеры от десятков микрон до десятков сантиметров, частицы переносились при помощи простой диффузии, как в прокариотических клетках, такой транспорт занимал бы слишком много времени. По приблизительным подсчетам, чтобы в результате теплового движения преодолеть расстояние от тела клетки до нервного окончания в некоторых моторных нейронах, небольшой везикуле потребовалось бы около 500000 лет [16]. Однако, благодаря так называемому быстрому аксональному транспорту с участием микротрубочек и моторного белка кинезина, это происходит гораздо быстрее.

По современным представлениям транспорт органелл в животных клетках происходит в две стадии: на большие расстояния они двигаются по микротрубочкам, а их локальное перемещение происходит по актиновым филаментам. Экспериментальное подтверждение этой модели впервые было получено Кузнецовым с соавт. [97] при исследовании транспорта мембранных везикул в аксоплазме кальмара, а затем и другими авторами при изучении транспорта меланосом в пигментных клетках лягушки [163] и рыбы [161] (рис. 1). Чтобы лучше понять, как организован внутриклеточный транспорт

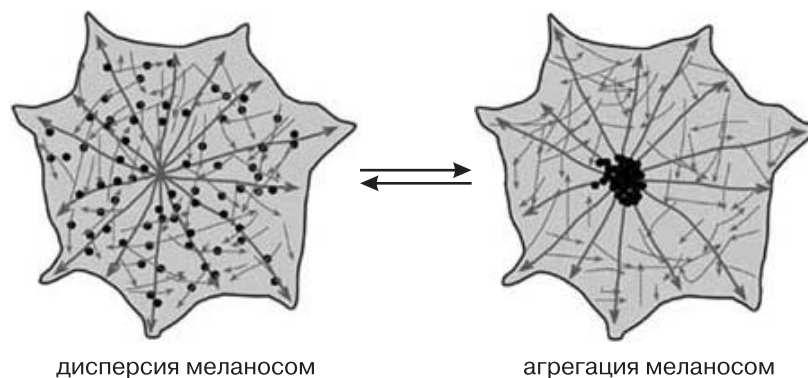


Рис. 1. Дисперсия и агрегация меланосом, специализированных органелл, наполненных меланином, происходит обратимо в ответ на внешние стимулы в меланофорах рыб и амфибий. Это приводит к изменению цвета их кожи, что важно для адаптации этих животных. Кинезин II и динеин, отвечающие за движение органелл по микротрубочкам, показаны большими стрелками, в то время как миозин V, взаимодействующий с актиновыми филаментами и отвечающий за равномерное распределение меланосом в клетке, показаны маленькими стрелками. (В. Гельфанд, С. Роджерс, личное сообщение).

с участием обеих цитоскелетных систем, следует подробнее остановиться на некоторых их общих свойствах, а также особенностях каждой из них.

ОБЩИЕ ЧЕРТЫ МИКРОТУБОЧЕК И АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ

Как было сказано ранее, микротрубочки и актиновые филаменты представляют собой полимерные фибриллы, состоящие из глобулярных белков, тубулина и актина, соответственно. Микротрубочки и актиновые филаменты являются динамичными структурами и постоянно находятся в процессе полимеризации-деполимеризации, причем обмен субъединиц в составе полимеров с теми, что находятся в растворенном виде в цитозоле, происходит на концах филаментов (рис. 2). Другим важнейшим свойством обеих цитоскелетных структур является их полярность, которая возникает от того, что протомеры (димеры из α - и β -тубулина в микротрубочках и мономеры актина в микрофиламентах) выстраиваются вдоль длинной оси по принципу «голова к хвосту». Концы полимеров таким образом оказываются разными: на одном — «головы» протомеров, а на другом — их «хвосты». Противоположные концы полимеров отличаются по своим свойствам. Так например, у них различны скорости поли-

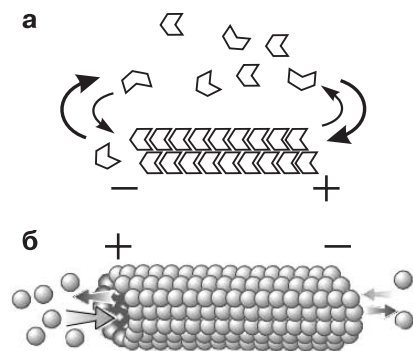


Рис. 2. Схематическое изображение динамики цитоскелетных фибрилл: актиновых микрофиламентов (а) и микротрубочек (б).

На схеме показано, что в актиновых микрофиламентах два, а в микротрубочках — 13 протофиламентов. Димеры, состоящие из α - и β -тубулина, изображены шариками. Стрелками разного размера показаны относительные скорости полимеризации и деполимеризации на плюс- и минус-концах полимера.

меризации и деполимеризации. В связи с этим различием быстрорастущие назвали плюс-концами, а медленно растущие — минус-концами. С плюс- и минус-концами филаментов взаимодействуют разные белки, оказывающие влияние на их свойства.

Полярность микротрубочек и актиновых филаментов имеет важнейшее значение для их транспортной функции, потому что все моторные белки могут передвигаться вдоль цитоскелетных структур только в определенном направлении. Большинство кинезинов передвигаются в направлении плюс-конца, а динеины и некоторые кинезиноподобные белки — к минус-концу микротрубочек [68]. Все миозины кроме миозина VI, способны двигаться в направлении плюс-конца актиновых филаментов [212].

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК

Микротрубочки представляют собой замкнутые цилиндрические поверхности, образованные продольными протофиламентами, с диаметром около 20 нм [208] (рис. 2,б). Кроме тубулина, основного белка микротрубочек, в их составе обнаружены также ассоциированные белки, которые связываются на их поверхности и влияют на их динамические свойства. Во время клеточного деления микротрубочки образуют довольно сложную структуру, называемую митотическим веретеном, в которой их плюс-концы связаны с центромерными участками хромосом, а минус-концы — закреплены в полюсах, содержащих центриоли. Правильность расхождения хромосом в процессе митоза зависит от слаженной работы нескольких моторных белков в составе веретена [17, 86].

От организации микротрубочек в клетках зависят многие протекающие в них процессы, и в значительной степени их свойства в целом. Во-первых, их специфическая ориентация внутри клеток

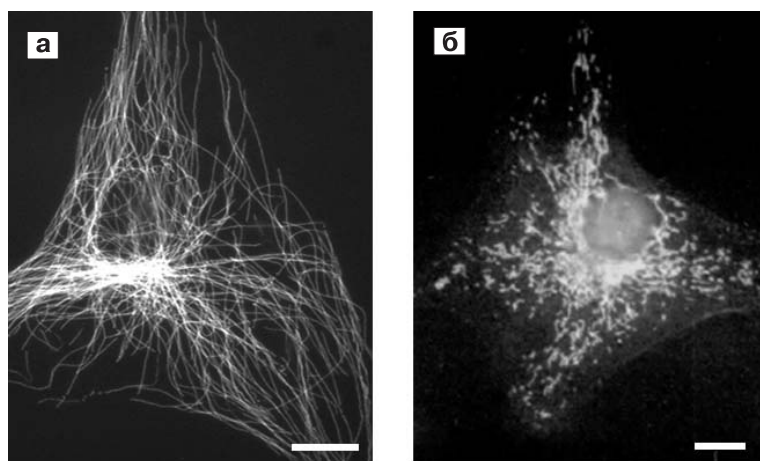


Рис. 3. Радиальное расположение микротрубочек (а) и митохондрий (б) в клетках CV-1.

Микротрубочки выявлены при помощи непрямого иммунофлуоресценции с использованием антител против тубулина. Митохондрии помечены при помощи химерного белка, содержащего фрагмент 8-ой субъединицы цитохромоксидазы и желтый флуоресцентный белок. Масштаб — 10 мкм.

определяет основные направления транспортных путей. В большинстве типов клеток они образуют радиальную систему с плюс-концами, ориентированными к периферии клеток, и весь транспорт в них организован также радиально (рис. 3). Во-вторых, динамические свойства микротрубочек позволяют им быстро перестраиваться в ответ на внешние сигналы, что в свою очередь приводит к изменению формы клетки [179]. С другой стороны, снижение динамики микротрубочек, характерное для дифференцированных клеток, связано, по-видимому, с их функциональной специализацией [22]. В культивируемых фибробластах обнаружено, что небольшая часть микротрубочек специфически стабилизируется в ответ на индукцию направленного движения клеток по субстрату [57], и пучок стабильных микротрубочек ориентируется в сторону движения клетки. Оказалось также, что такой клеточный ответ находится под контролем лизофосфатидной кислоты и TGF β (трансформирующего ростового фактора бета) [58].

ОСОБЕННОСТИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

Актиновый цитоскелет представляет собой довольно сложную систему филаментов, соединенных между собой и образующих как трехмерные сети, так и параллельные пучки (рис. 4). Актиновые

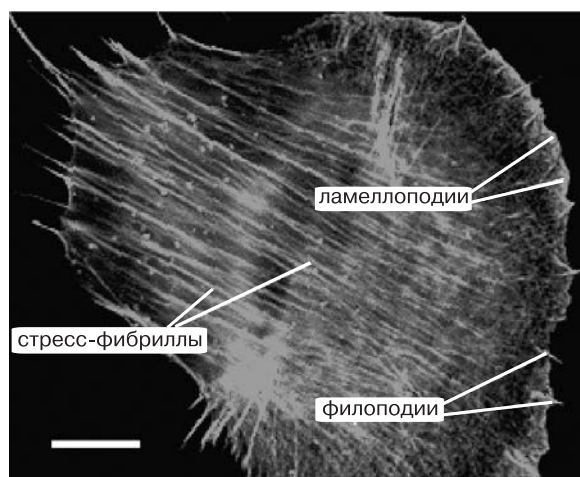


Рис. 4. Актиновый цитоскелет фибробласта.

На микрофотографии показана клетка, в которой актиновые структуры выявлены при помощи флуоресцентно-меченого фаллоидина, специфически связывающегося с полимерным актином. Масштаб — 10 мкм.

филаменты имеют форму двойной спирали толщиной 10 нм [152]. Различают такие структуры, состоящие из актиновых филаментов, как стресс-фибриллы, кортикальный слой, ламеллоподии, филоподии и некоторые другие [183]. В культивируемых животных клетках все актиновые структуры можно разделить на две основные группы по расположению в них отдельных микрофиламентов.

Филоподии, или микроспайки, представляют собой тонкие (около 0,2 мкм толщиной) параллельные пучки актиновых филаментов, которые могут в разной степени выступать на поверхности клетки. Ламеллоподии — это плоские выступы на периферии клетки, в которых актиновые филаменты образуют сеть. Актиновые филаменты как в филоподиях, так и в ламеллоподиях располагаются полярно, т.е. все они направлены своими быстрорастущими плюс-концами в сторону края клетки. Степень экспрессии и тех и других может сильно варьировать в зависимости от типа клеток и внешних условий. Эти цитоскелетные образования являются очень динамичными и принимают участие в таких процессах, как распластывание клеток на субстрате, движение, а также фагоцитоз [184]. Примером актиновых структур со смешанной полярностью могут служить стресс-фибриллы и кольцевые пучки, в которых плюс-концы отдельных микрофиламентов направлены в обе стороны. Они состоят из пучков биполярных филаментов как актиновых, так и состоящих из миозина II [65, 190].

Эти структуры обладают способностью сокращаться и при формировании требуют прикрепления клетки к субстрату [143].

Форма клеток, а также их движение относительно субстрата в значительной степени зависят от актинового цитоскелета, структура которого находится под контролем внешних факторов. В результате серии работ из лаборатории А. Холла [143, 158] стало известно, что ключевую роль в этой регуляции играют малые ГТФазы из семейства Rho: белки Rac1, Cdc42 и RhoA. Оказалось, что для образования филоподий необходима активация белка Cdc42, а белок Rac1 контролирует образование ламеллоподий [143, 158]. Внешними факторами, вызывающими активацию этих регуляторных белков, могут быть инсулин, тромбоцитарный ростовой фактор (PDGF) [158], а также белки внеклеточного матрикса. Образование стресс-фибрилл находится под контролем белка RhoA, активация которого происходит под действием другого ростового фактора — лизофосфатидной кислоты [158]. Кроме внешних факторов, определяющих состояние этих белков, на их активность влияют также как их взаимодействия между собой, так и с некоторыми другими клеточными структурами, например, микротрубочками [213]. В результате актиновый цитоскелет представляет собой сложную систему, способную быстро перестраиваться в ответ на различные стимулы.

Чтобы легче представить, как осуществляется координация перестроек в актиновом цитоскелете и в системе микротрубочек с транспортом мембранных органелл, можно привести в качестве примера псевдоподиальную активность на переднем краедвигающегося по субстрату фибробласта. В ответ на внешние стимулы на периферии клетки через малую ГТФазу Rac1 активируются процессы полимеризации актина и образования ламеллоподий. Кроме полимерного актина эти клеточные выросты при образовании требуют увеличения площади плазматической мембраны. Такой процесс обеспечивается активным встраиванием фосфолипидных везикул в плазматическую мембрану как раз в местах выпячиваний. Липидные везикулы формируются в аппарате Гольджи и доставляются к местам встраивания по микротрубочкам при помощи моторных белков. Те же сигналы, которые индуцируют образование ламеллоподий на переднем крае клетки, через белок Rac1 стимулируют рост плюс-концов микротрубочек в том же направлении, что и клеточные выросты. Таким образом, своевременная доставка необходимых компонентов к переднему краю обеспечивается благодаря параллельным перестройкам в актиновом цитоскелете и системе микротрубочек.

Из сказанного выше ясно, что система микротрубочек и актиновые структуры цитоскелета представляют собой сложный, способный к

быстрым перестройкам в ответ на внешние сигналы белковый комплекс, который выполняет структурную функцию и определяет такие свойства клеток, как форма, подвижность и многие другие. Вместе с тем, являясь основой внутриклеточного транспорта, микротрубочки и актиновые филаменты вместе с моторными белками играют решающую роль в клеточном делении, секреции, фагоцитозе и др. Способность к структурным перестройкам цитоскелета является одним из основных факторов, регулирующих внутриклеточный транспорт.

III. МНОГООБРАЗИЕ МОТОРНЫХ БЕЛКОВ

В этой части обзора мы рассмотрим три класса молекулярных моторов, участвующих во внутриклеточном транспорте. Это кинезины, динеины и миозины — белковые молекулы, имеющие некоторые общие черты в своем строении. По данным электронной микроскопии наиболее изученные моторы (аксонемный динеин, обычный кинезин и мышечный миозин) представляют собой продолговатые молекулы длиной 40–100 нм. У них имеется две или три «головы» (моторные домены), которые примыкают к стержневой части молекулы. У кинезина и динеина противоположный конец стержня (хвостовой домен) также имеет глобулярную структуру.

Однако, по мере изучения большего числа моторных белков, оказалось, что их морфология очень разнообразна. Внутри каждого класса белки обладают разной степенью гомологии по последовательности аминокислот моторного домена. Хвостовые области этих молекул сильно отличаются по размеру, структуре и аминокислотной последовательности, особенно это касается кинезинов и миозинов. Считается, что именно хвостовой домен определяет специфичность в отношении грузов (митохондрий, эндосом, лизосом, элементов цитоскелета и др.), переносимых данным белком.

КИНЕЗИНЫ

Представители этого семейства играют важную роль во многих клеточных процессах, включая транспорт внутриклеточных органелл [68], формирование веретена и сегрегацию хромосом во время митоза и мейоза [45], регуляцию количества микротрубочек, их длины и динамических свойств [38, 80, 171]. Кинезины обладают консервативным моторным доменом длиной около 350 аминокислотных остатков, который содержит каталитический центр, отвечающий за гидролиз АТФ и связывание с микротрубочками, и примыкающий к нему шейный участок, состоящий из 40 а.о. [201].

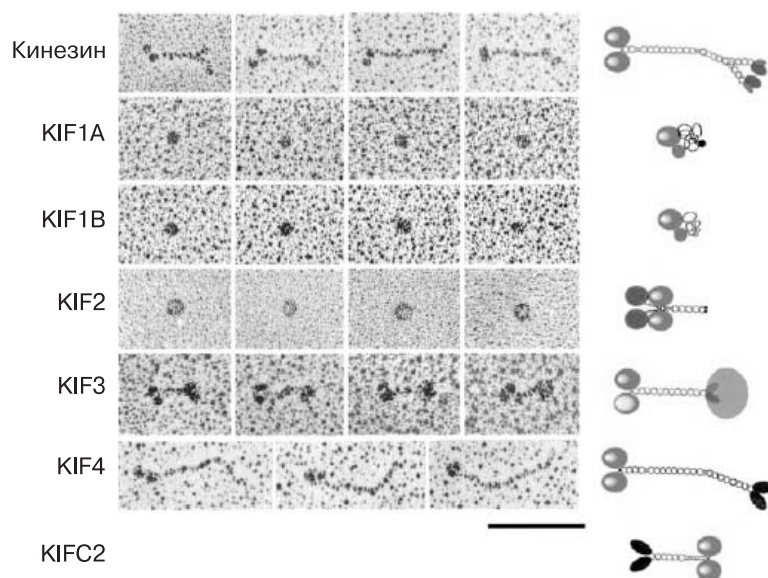


Рис. 5. Электронномикроскопические фотографии основных представителей семейства кинезинов (слева). Масштаб — 100 нм.

Схематические изображения тех же кинезинов, основанные на данных электронной микроскопии или предсказанные по первичной структуре (справа) [68].

По положению моторного домена в семействе кинезинов выделяют три основных типа: N-тип (моторный домен находится на NH_2 -конце молекулы); M-тип (моторный домен — посередине молекулы) и C-тип (моторный домен — на COOH -конце). К N-типу относятся семейства KHC, Unc104/KIF1, KIF3/KRP_{85/95}, KIF4 и Klp67A. Семейство KIF2 относится к M-типу; к C-типу относятся белки семейства KIFC2/C3 (рис. 5).

Белки N-типа

К этому типу относится семейство обычных кинезинов. Три представителя этого семейства (KIF5A, KIF5B, KIF5C) были найдены у мышей [4, 66, 67, 135] и два — у человека (HsuKHC и HsnKHC) [139, 141]; KIF5B и HsuKHC экспрессируются во многих тканях, в то время как KIF5A, KIF5C и HsnKHC специфичны для нервной ткани.

Наиболее изученной является молекула обычного кинезина, KIF5A, которая состоит из двух тяжелых (120 кДа) и двух легких цепей (64 кДа) [15, 18, 175, 203]. Молекулу кинезина можно поделить на

три функциональные части: N-концевой моторный домен, который обратимо связывается с микротрубочками и превращает химическую энергию в движение; C-концевая часть молекулы, которая вместе с легкими цепями отвечает за связывание грузов, и соединяющий их стержневой суперспиральный домен [69]. Существует несколько изоформ легких цепей, которые участвуют в специфическом узнавании различных органелл [87]. В моторном домене молекулы выделяют две основные части: глобулярный домен с каталитическим центром (около 350 а.о.) одинаковым у всех представителей семейства, и шейную область из 40 а.о., прилегающая к C-концу глобулярного домена. Шейная область, которая одинакова лишь внутри определенного кинезинового класса, вместе с каталитическим доменом отвечает за движение молекулы. Затем следует длинный α -спиральный участок, называемый стержнем, который в димере кинезина имеет структуру супер-спирали и связывает моторный домен с C-концевой частью молекулы, имеющей глобулярную структуру [219].

Работы по исследованию функций кинезина свидетельствуют о том, что кинезин — плюс-концевой мотор, участвующий в таких транспортных процессах как аксональный антероградный транспорт (т.е. происходящий от центра клетки к периферии) [51, 70]; транспорт везикул между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикулом (ER) [110]; распределение митохондрий [193]; цилиндрическое вытягивание лизосом [72, 136] и базолатеральный транспорт в эпителиальных клетках [98].

К кинезинам N-типа относятся также так называемые мономерные моторы для быстрого антероградного транспорта — семейство Unc104/KIF1. Белок Unc104 в *C. elegance* является нейрон-специфичным мотором для антероградного транспорта синаптических везикул вдоль аксональных микротрубочек [60, 147]. Представитель этого семейства, KIF1A, найденный в клетках мышей, представляет собой глобулярную молекулу диаметром 14 нм, существующую в виде мономера [146]. KIF1A, специфически экспрессирующийся в нейронах, является самым быстрым микротрубочковым плюс-концевым мотором у млекопитающих (1,2–1,5 мкм/с *in vitro*), осуществляющим антероградный транспорт в аксонах. Грузом для KIF1A служит ряд предшественников синаптических везикул, содержащих синаптофизин, синаптоагмин и Rab3A [146]. Еще один представитель Unc104/KIF1 семейства — KIF1B — служит для антероградного транспорта митохондрий [137]. Таким образом, белки этого семейства участвуют в транспорте синаптических везикул и митохондрий в нейронах. До самого последнего времени считалось, что это мономерные плюс-концевые моторы. Однако механизм, согласно которому эти одноголовые моторы способны двигаться вдоль микротрубочек, оставался

неясным. Способ попеременного связывания разных голов с микротрубочкой, предложенный для движения димерных моторов [11, 67, 202], в этом случае не подходил. Недавно в лаборатории Р. Вэйла (Сан Франциско, США) было показано, что белки этого класса, как и остальные кинезины, функционируют в виде димеров, но легко переходят в мономерное состояние [196].

Представители семейства KIF3/KRP_{85/95} — это гетеродимерные моторы, которые также относятся к N-типу. KIF3A-KIF3B гетеродимер собирается вместе с белком KAP3 и образует гетеротримерную молекулу. Такой белок является плюс-концевым мотором, перемещающимся со скоростью 0,3 мкм/с [4, 66, 90, 217, 218]. Кинезины этого семейства участвуют в антероградном транспорте мембранных органелл, 90–160 нм в диаметре, отличных от предшественников синаптических везикул и везикул, транспортируемых другими моторами, такими как обычный кинезин и KIF2 [90, 217].

Моторы семейства KIF4 [4, 66, 180] ко-локализованы с мембранными органеллами в конусе роста дифференцирующихся нейронов и в цитоплазме фибробластов. Во время митоза KIF4 ко-локализуется с мембранными органеллами в митотическом веретене. Таким образом, этот белок является плюс-концевым мотором, участвующим в транспорте мембранных органелл в растущих нейронах и других клетках [180]. Хромокинезин, куриный аналог KIF4, может связываться с хромосомами и функционировать как митотический мотор с ДНК в виде карго [209]. Учитывая то, что KIF4 тоже содержит ДНК-связывающий домен, сходный с таковым у хромокинезина, KIF4 может иметь дополнительную функцию, такую как транспорт мРНК в некоторых видах и на разных этапах развития клеток.

Последним мотором N-типа является Klp67A из дрозофилы. Это плюс-концевой мотор (0,05 мкм/с), который функционирует во время митоза и может играть роль в локализации митохондрий в области полюса митотического веретена [149].

Белки M-типа

KIF2 (716 а.о., молекулярный вес 80945) — единственный белок из суперсемейства кинезинов, принадлежащий к M-типу [4, 66]. N-концевой домен из 189 аминокислот и центральный, по всей вероятности моторный домен, имеют предположительно глобулярную структуру, а СООН-концевой участок большей частью представлен α -спиральными последовательностями. KIF2 образует гомодимер — глобулярную молекулу диаметром около 16 нм. KIF2, являющийся плюс-концевым мотором, экспрессируется почти во всех тканях, особенно в развивающихся аксонах (по мере роста экспрессия снижается).

KIF2 транспортирует везикулы 100–120 нм в диаметре, локализованные преимущественно в конусе роста нейронов.

Белки С-типа. Семейство KIFC2/C3

Моторные белки этого типа, *ncd* у дрозофилы и *Kar3* у дрожжей, участвуют в митозе и мейозе [46, 118, 119, 121]. Представители этого семейства двигаются в направлении минус-конца микротрубочек. Молекулы KIFC2 образуют гомодимер и локализованы в основном в теле нервной клетки и дендритах [167]. Грузом для него служат мембранные органеллы, напоминающие мультивезикулярные тельца [167].

ДИНЕИНЫ

Семейство этих белков состоит из двух основных классов: аксономных динеинов, при участии которых происходят колебательные движения ресничек и жгутиков [168, 189], и цитоплазматических динеинов, которые в большинстве клеток обеспечивают основные типы транспорта органелл в направлении минус-конца микротрубочек [30, 39, 132, 174, 178]. Цитоплазматический динеин также участвует в локализации внутриклеточных органелл [7, 33, 50, 73, 145], организации системы микротрубочек в интерфазных клетках [92], сборке и разделении митотического аппарата [44, 150, 171, 186, 200, 206].

От других моторных белков динеины отличаются большими размерами: их тяжелые цепи, аналогичные по функциям тяжелым цепям кинезина и миозина и содержащие моторный домен, достигают 600 кДа. Вся молекула динеина состоит из большого числа субъединиц с суммарной массой около 1.200 кДа (рис. 6). Предполагается, что большой размер тяжелых цепей динеина необходим для связывания многочисленных промежуточных и легких цепей этого белка. Роль многих компонентов пока неясна и предстоит выяснить их участие в регуляции связывания и транспорта различных грузов. Большое разнообразие функциональных задач (например, быстрый и медленный аксональный транспорт) подразумевает наличие нескольких цитоплазматических изоформ. Однако до недавнего времени была изучена только одна форма цитоплазматического динеина. Этот обычный цитоплазматический динеин (другое название – DNC1a) найден у всех эукариот и образует двухголовый гомодимер [140, 204].

Полный комплекс цитоплазматического динеина состоит из двух тяжелых цепей массой 530 кДа, трех промежуточных цепей массой 74 кДа и четырех легких промежуточных цепей, от 55 до 60 кДа [74, 112, 148, 174, 177, 178]. Кроме того, в составе молекулы динеина обнаружены многочисленные легкие цепи массой от 8 до 10 кДа, состав которых в разных источниках сильно отличается [126]. Основываясь

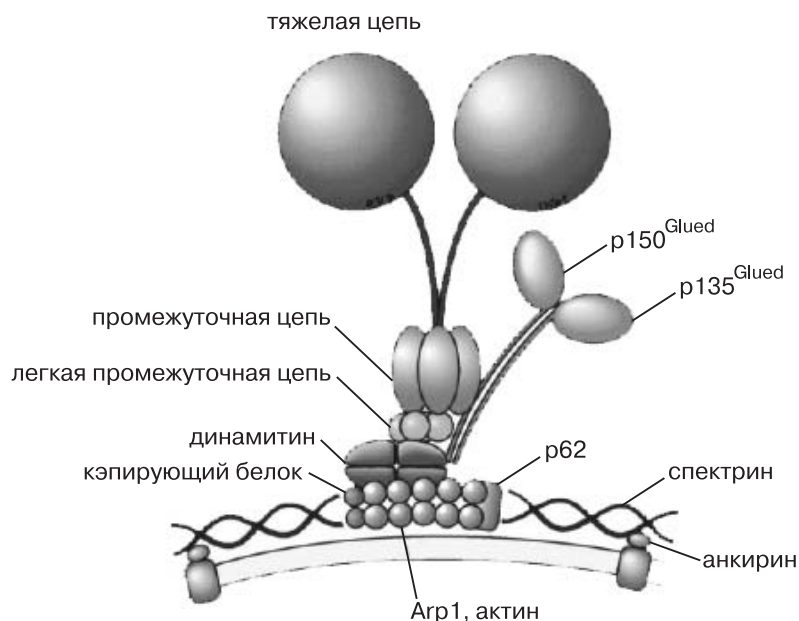


Рис. 6. Схематические изображения цитоплазматического динеина вместе с динактиновым комплексом.

Динеин связан с органеллами при помощи сложного комплекса, включающего анкирин, спектрин, Arp1-актин, динамитин, p150 и промежуточную цепь [65, 68].

на сравнении первичной структуры тяжелых цепей цитоплазматического и аксонемного динеина, предполагается, что центральная и С-концевая области образуют глобулярный домен, взаимодействующий с микротрубочками и обладающий механо-химической активностью. Что касается N-концевой области, то считается, что она является местом связывания груза [47, 91, 125, 222].

Помимо промежуточных и легких промежуточных цепей, цитоплазматический динеин ассоциирован с белковым комплексом динактином [55, 173]. Динактин включает 10 субъединиц: p150^{Glued}, p135^{Glued} (вариант p150^{Glued}, специфический для мозга), p62, динамитин (p50), актиноподобный белок 1 (Arp1), актин, субъединица α -актин-кэпирующего белка, p27 и p24 в стехиометрии 1:1:1:4:9:1:1:1:1:1. Динактин непосредственно взаимодействует с динеиновыми промежуточными цепями посредством выступающей боковой части, образованной вокруг p150^{Glued} субъединицы [84, 185, 205]. Другой структурный домен динактина, базирующийся на минифиламенте Arp1, участвует в связывании динеина с карго [173].

Из более поздних работ [52, 195] стало известно о существовании ряда изоформ тяжелой цепи цитоплазматического динеина, выполняющих по-видимому разные задачи. На сегодняшний день идентифицировано несколько тяжелых цепей этого белка — две у крыс (CyDn и DLP4) [195], две у морского ежа (DHC1A и DHC1B) [52] и три — в клетках HeLa (DHC1, DHC2 и DHC3) [199]. Тяжелые цепи обычного цитоплазматического динеина CyDn, DHC1A и DHC1 являются гомологами; DLP4, DHC1B и DHC2 также гомологичны друг другу. DHC2 локализована преимущественно в аппарате Гольджи, в то время как DHC3 ассоциирован с неизвестными пока структурами [199]. Идентификация новых изоформ цитоплазматического динеина, имеющих специфическую локализацию внутри клетки [35], подтверждает гипотезу о функциональной специализации цитоплазматических динеинов и аксонемные изоформы. По-видимому, подобно представителям семейства кинезинов, динеины, содержащие разные изоформы, отвечают за транспорт различных органелл.

МИОЗИНЫ

Моторные белки этого семейства связаны с актиновыми микрофиламентами и участвуют в разных формах движения эукариотических клеток, таких как цитокинез, фагоцитоз, рост конуса при росте аксона, сохранение формы клетки, транспорт органелл и частиц. Остановимся на транспортной функции этого класса белков. Первым экспериментальным подтверждением участия актина в транспорте органелл в клетках животных стала работа Кузнецова с соавт. [97]. Последующие работы других лабораторий показали, что в нейронах внутриклеточные частицы способны двигаться вдоль актиновых филаментов в ламеллоподии конуса роста аксона [130], а также что транспорт эндоплазматического ретикулума и синаптических везикул в этих клетках также является актин-зависимым [19, 48, 154, 191, 192]. На сегодняшний день существует много примеров актин-зависимого транспорта органелл и в других типах животных клеток: транспорт меланосом в пигментных клетках позвоночных [161, 163, 215], транспорт митохондрий в целомочитах морского ежа [95], транспорт гранул в синцитийной бластомере в эмбрионах дрозофилы [123, 124], экзоцитоз везикул в эпителиальных клетках кишечника [50]. Необходимо отметить, что во всех указанных случаях транспорт идет как по актиновым филаментам с участием миозинов, так и по микротрубочкам.

Принадлежность к миозиновому суперсемейству определяется наличием тяжелой цепи с консервативным каталитическим доменом 80кДа (рис. 7). Известно 15 классов тяжелых цепей миозина [10],

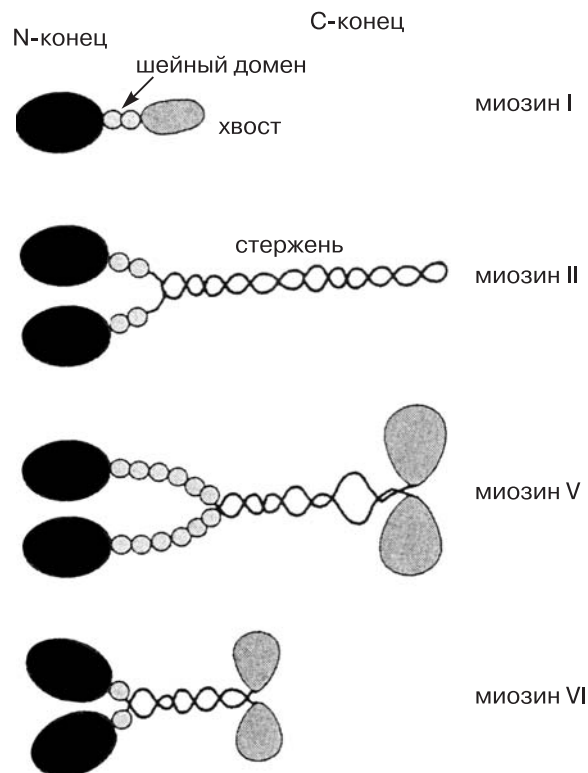


Рис. 7. Схематические изображения миозинов, принимающих участие в транспорте органелл.

Эти белки по строению сходны с кинезинами и состоят из моторного домена, шейного участка, супер-спирального стержня и глобулярного хвостового домена. Легкие цепи миозинов связываются с их шейными участками [157].

классификация которых основывается на сходстве последовательностей моторного домена [20, 28]. Все представители суперсемейства имеют сходное строение моторного домена, но внутри класса гомология наибольшая. В большинстве миозинов за каталитическим доменом следует α -спиральный участок для связывания легких цепей. Кроме того, почти все миозины имеют С-концевой хвост и/или N-концевое продолжение цепи, которые, по-видимому, и обеспечивают такие класс-специфические свойства, как связывание мембран и протеинкиназная активность.

Миозин I

Первыми среди миозинов, вовлеченных в транспорт органелл, были идентифицированы мини-миозины I класса. В лаборатории Т. Полларда [2] было показано, что движение, выделенных из *Acanthamoeba*, органелл вдоль актина *in vitro* можно ингибировать с помощью блокирующих функцию антител против миозина I. Моторы этого класса являются мономерами и состоят из тяжелой цепи, имеющей молекулярный вес 110–130 кДа, и от одной до шести кальмодулиновых легких цепей. Хвостовые области различных изоформ тяжелых цепей отличаются по длине и аминокислотной последовательности. Множественные изоформы миозинов I класса могут возникать в результате альтернативного сплайсинга [63]. Этот класс миозинов подразделяется на четыре подкласса в соответствии с гомологией внутри головного домена [32].

Миозин II

Другой класс этого суперсемейства образуют миозины II, в состав которых входят обычный или мышечный миозин и его ближайший аналог из неммышечных клеток. Представители этого класса играют важную роль в таких процессах как цитокинез, установление полярности клетки и клеточная миграция. Из недавних работ стало известно, что миозин II участвует также в транспорте органелл. Было показано, что этот мотор ассоциирован с транс-Гольджи (TGN) и необходим для формирования базолатеральных транспортных везикул; подавление АТФ-азной активности мотора ингибирует этот процесс [133, 187].

Миозины II состоят из двух тяжелых цепей массой 240 кДа и двух пар легких цепей (15–20 кДа). В тяжелой цепи выделяют два основных домена – N-концевой домен около 95 кДа, который имеет сайты связывания для АТФ, актина и легких цепей, и C-концевой хвостовой домен, который образует длинную спираль-спиральную структуру. Головной домен отвечает за моторную функцию, а хвостовой необходим для взаимодействия с другими молекулами миозина при формировании биполярных толстых филаментов.

Миозин V

В настоящее время принято считать, что центральную роль в миозиновом транспорте органелл занимают представители класса миозина V. Они состоят из двух тяжелых цепей и 12 легких [29]. Структурно молекулу тяжелой цепи можно поделить на три домена: N-концевая глобулярная голова, α -спиральная шея и спираль-спиральный стержневой домен, заканчивающийся глобулярным C-концевым доменом, который предположительно является местом связывания карго [27, 156, 176, 215].

Лучше всего охарактеризованы миозины V класса, выделенные из куриного мозга [29]. Этот белок, названный миозином Va, отличается от других представителей семейства высоким сродством к актину в присутствии АТФ [138] и может быть связан с актином большую часть АТФ-азного цикла [76, 104]. Это свойство данного мотора уменьшает вероятность того, что органелла может соскочить с актинового трека в фазе цикла, когда мотор не прикреплен к актину. Для миозинов II класса, участвующих в сокращении, а не в транспорте органелл, таких проблем не возникает, поскольку они находятся в составе больших надмолекулярных комплексов (толстые филаменты). Таким образом, всегда имеется несколько миозинов класса II, связанных с актином. Число миозинов V класса, одновременно взаимодействующих с актином, намного меньше. Как отмечалось выше, миозин V является димером. При движении вдоль актина один из моторных доменов может быть связан с актином, в то время как другой нет. Таким образом, одна димерная молекула миозина V может двигаться вдоль актиновой нити попеременно связываясь с актином то одним доменом, то другим. Длина миозиновой шеи, α -спирального участка, соединяющего мотор с димеризованным хвостом, играет важную роль в этом механизме. Миозины V класса имеют более длинные шейные участки по сравнению с миозинами II класса, поэтому считается, что они перемещаются более длинными шагами вдоль актиновых филаментов [20].

Миозин V участвует в транспорте меланосом в меланофорах *Xenopus* и мышечных меланоцитах [155, 163, 164, 215]. Кроме того, с участием миозина Va происходит также транспорт органелл в нейронах. Данные исследований электронной микроскопии клеток Пуркинье, взятых у нокаутных по миозину Va мышей, указывают на то, что гладкий эндоплазматический ретикулум не вытягивается в дендритные отростки, как это происходит в мышцах дикого типа [192]. Показано также, что миозин Va ассоциируется с синаптическими везикулами и транспортирует их через богатые актином области к синапсу [19, 154]. Другой белок, миозин Vb, ко-локализуется с эндосомами в поляризованных и неполяризованных клетках и, возможно, играет роль в цикле компонентов плазматической мембраны [96]. Существует, по крайней мере, еще два подкласса, функции которых еще не идентифицированы [223].

Миозин VI

Миозины VI класса также участвуют во внутриклеточном транспорте, хотя их функции еще недостаточно хорошо изучены. В отличие от других миозинов, миозин VI движется в направлении минус конца

актиновых филаментов *in vitro* [23, 63]. Этот мотор экспрессируется во многих тканях и существует в виде изоформ, которые образуются в ходе альтернативного сплайсинга. В молекуле миозина VI выделяют три структурных домена: головной, шейный и хвостовой [63]. Этот белок, в отличие от других известных миозинов, имеет вставку из 53 аминокислот между головным и шейным доменами [212]. Считается, что именно эта вставка обеспечивает направление движения в сторону минус-конца актиновых филаментов, наблюдаемое для миозина VI [212]. С-конец хвостового домена имеет глобулярное строение, а для его периферической части предсказана α -спиральная структура, которая позволяла бы образовывать димер.

Таким образом, наличие в клетках множества моторных белков, составляющих три больших суперсемейства, включающих в себя представителей, отличающихся как по форме, так и по функциям, отражает то огромное многообразие процессов, которые происходят в клетках и требуют постоянного перемещения различных клеточных компонентов. С другой стороны ясно, что для координирования работы всего этого множества моторных белков необходима совершенная система регуляции.

IV. РЕГУЛЯЦИЯ МОТОРНЫХ БЕЛКОВ

Моторные белки – это ферменты, катализирующие реакции, результатом которых является превращение энергии АТФ в механическое движение органелл вдоль актиновых филаментов или микротрубочек. Моторный домен связывает цитоскелетные структуры и АТФ и генерирует силу для движения, а хвостовой домен связывает груз и определяет, таким образом, биологическую функцию данного мотора в клетке. Существует много различных путей регуляции моторных белков: регуляция их ферментной активности, регуляция их сродства к грузу, регуляция их сродства к цитоскелетным структурам, а также регуляция их уровня в клетках. Причем в большинстве случаев задействовано сразу несколько путей регуляции этих белков.

Важнейшим наблюдением, сделанным в ходе изучения регуляции моторных белков, было то, что они часто образуют комплексы с известными компонентами систем передачи сигналов. Среди таких участников регуляторных каскадов были обнаружены протеинкиназы, фосфатазы и малые G-белки. Связь с ними моторных белков может обеспечить эффективную регуляцию транспортных процессов в ответ на различные внешние сигналы. Одним из примеров такой регуляции является фосфорилирование.

РЕГУЛЯЦИЯ ПОСРЕДСТВОМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Кинезины

Самые первые работы по изучению регуляции активности моторных белков были посвящены фосфорилированию обыкновенного кинезина [71, 170]. Фосфорилирование КНС *in vitro* посредством сАМР-зависимой протеинкиназы (РКА) уменьшало связывание мотора с синаптическими везикулами. Кроме того, везикулы, преинкубированные с фосфорилированным кинезином, хуже связывались с микротрубочками чем везикулы, преинкубированные с нефосфорилированным кинезином [170]. Хотя эти данные указывали на то, что фосфорилирование кинезина снижает подвижность везикул, наблюдения, сделанные *in vivo*, свидетельствуют об обратном. Разделение связанной с мембранами и растворимой фракций кинезина в гомогенатах симпатических нейронов показало, что мембранная фракция, которая является активной, содержит большей частью фосфорилированную тяжелую цепь (КНС), в то время как растворимая фракция фосфорилирована в меньшей степени [101]. Очевидное противоречие между результатами, полученными *in vitro* и *in vivo*, можно объяснить тем, что фосфорилирование при помощи РКА *in vitro* не воспроизводит события, происходящие в живой клетке. Действительно, эксперименты по фосфопептидному картированию кинезина в работе П. Холленбека [71] показали, что при пост-лизисной протеинкиназной реакции тяжелые и легкие цепи кинезина могут фосфорилироваться в местах, которые *in vivo* не фосфорилируются.

В поляризованных эпителиальных клетках фосфорилирование кинезина коррелирует с увеличением связывания его с везикулами и повышенной моторной активностью. Так, в секреторных клетках поджелудочной железы фосфорилирование кинезина сопровождается увеличением доли кинезина, ассоциированного с зимогеновыми гранулами в ответ на секреторный стимул [116]. В секреторных клетках из слезных желез, стимуляция секреции коррелирует с увеличением активности кинезина, измеренной при помощи кинезин-зависимого скольжения микротрубочек *in vitro* [61].

Фосфорилирование легких цепей также может влиять на активность кинезина. Гипер-фосфорилирование кинезин-ассоциированных белков, вызываемое обработкой цитозоля фибробластов оокадаевой кислотой (ингибитор фосфатаз), коррелировало с увеличением кинезин-зависимого движения везикул *in vitro*, а также с увеличением активности кинезина при скольжении микротрубочек по стеклу [120]. В последующих экспериментах было показано, что кинезин при очистке из экстракта фибробластов выделяется вместе с двумя белками: протеинкиназой с массой 100 кДа и фосфатазой 1 типа с

массой 150 кДа [109]. Эти белки участвовали в фосфорилировании и дефосфорилировании 79 кДа изоформы легких цепей кинезина, которая была единственным белком в очищенной фракции моторов, фосфорилирующимся при инкубации с оокадаевой кислотой.

Известно, что протеинкиназы и фосфатазы локализованы обычно в непосредственной близости с субстратами. Многие ферменты этих типов имеют по несколько потенциальных белков-мишеней и для участия в регуляции какого-то определенного белка киназа/фосфатаза должна быть локализована в определенном месте. Примером такой локализации может служить связывание РКА и РКС (протеинкиназ А и С) с мембранными структурами, которое предшествует их взаимодействию с различными субстратами [31, 37, 129]. Кинезин также способен ассоциироваться с киназами/фосфатазами, однако роль этих взаимодействий в регуляции не всегда известна. В некоторых случаях ассоциированная с кинезином киназа/фосфатаза участвует в регуляции кинезина, в других случаях сигнальные молекулы очевидно используют кинезин в качестве транспортного средства для их специфической доставки и действия на локализованный субстрат.

Представитель семейства *bimC* из человеческих клеток – белок Eg5 – фосфорилируется во время митоза по остатку треонина в так называемом *bimC* боксе, расположенном в С-концевом участке молекулы. Кроме того было показано, что этот же остаток фосфорилируется *in vivo* р34cdc2 киназой [13]. Замена этого треонина на нефосфорилируемый аланин приводит к нарушению локализации Eg5 в веретене деления, в то время как замена треонина на серин эту локализацию сохраняла, свидетельствуя тем самым, что фосфорилирование Eg5 приводит к его локализации в веретене деления [13, 172]. Иммунофлуоресцентные опыты на KLP61F из дрозофилы (другой представитель *bimC* кинезинового семейства) с использованием антител против фосфорилированного *bimC* бокса также показали, что в веретене присутствует только фосфорилированный мотор, а нефосфорилированный нет [181]. В молекуле Eg5 был идентифицирован еще один сайт, который может фосфорилироваться *in vitro* рEg2 киназой, необходимой при сборке веретена деления в экстрактах *Xenopus* [53, 165]. Eg5 и рEg2 колокализуются в области цетросомы в профазе и позже в митозе на полюсах микротрубочкового веретена. Eg5 иммунопреципитируется с рEg2, а также связывает рEg2 *in vitro* [53]. Оба белка необходимы для сборки веретена в экстрактах *Xenopus*, предполагая, таким образом, что рEg2 способен регулировать Eg5 в этом процессе.

Кинезин CENP-E во время митоза фосфорилируется *in vivo* по четырем аминокислотным остаткам на С-концевом участке моле-

кулы [106]. Эта часть молекулы способна связываться с микротрубочками *in vitro*, и фосфорилирование ингибирует это связывание [106]. Митоген-активируемая протеинкиназа (МАР киназа) и p34cdc2 киназа фосфорилируют СЕНР-Е *in vitro* по всем четырем остаткам со сходной кинетикой и избирательностью [106, 221], однако остается неизвестным какая из этих киназ фосфорилирует СЕНР-Е *in vivo*. В работе Ляо с соавт. [106] высказано предположение о том, что p34cdc2 фосфорилирует СЕНР-Е и подавляет его взаимодействие с микротрубочками таким образом, что он ассоциируется с кинетохорами до начала анафазы, когда уменьшение активности p34cdc2 позволяет СЕНР-Е участвовать в удлинении веретена.

Другие митотические кинезины также способны напрямую связываться с киназами. *Pavarotti*, кинезин из *Drosophila*, необходимый для формирования структуры телофазного веретена и организации контрактильного кольца, связывает polo киназу, которая играет важную роль в функционировании центросомы и в цитокинезе [3, 26]. *Pavarotti* отвечает за доставку polo к центросоме и центральному веретену во время поздней анафазы, однако остается неизвестным, участвует ли polo в регуляции *Pavarotti* [3].

Динеины

У цитоплазматического динеина наблюдалось фосфорилирование тяжелых, промежуточных и легких цепей [40, 41, 54, 77, 107, 151, 166]. Опыты по сравнению различных фракций мозга крысы показали, что тяжелая цепь динеина в разных отделах по-разному фосфорилируется. Так, в оптическом тракте, богатом везикулами, которые двигаются антероградно, тяжелая цепь динеина была фосфорилирована в меньшей степени, нежели в клеточной фракции [40]. Хотя эта работа указывает на то, что фосфорилирование тяжелой цепи коррелирует с повышенной активностью динеина, по другим данным фосфорилирование ДНС коррелировало с уменьшением активности мотора.

На культуре крысиных гепатоцитов было показано, что обработка клеток омега-3 кислотой приводила к повышенному фосфорилированию тяжелой цепи динеина и его диссоциации с лизосом [166]. Уровень динеина, связанного с мембранами эндосом, при этом не изменялся. Однако наблюдалось снижение АТФ-азной активности во фракции динеина, снятой с микротрубочек. На основании этих результатов авторы статьи постулировали, что АТФ-азная активность динеина снижается из-за фосфорилирования его субъединиц. Противоречие результатов, касающихся корреляции между фосфорилированием ДНС и его активностью может быть связано с фосфорилиро-

ванием различных сайтов одной той же тяжелой цепи или с различием свойств разных ДНС генных продуктов или изоформ.

В работе [6] было показано, что динеин-зависимый транспорт везикул непосредственно регулируется фосфорилированием. Число событий динеин-зависимого движения возрастало в присутствии ооадевой кислоты в концентрации, которая свидетельствовала об участии фосфатазы I типа. Это активированное движение блокировалось 6-диметиламинопурином, ингибитором киназ широкого спектра действия. Ингибирование фосфатазы не оказывало влияния на скорость и продолжительность движения трубочек ЭР, а также на количество динеина, ассоциированного с мембранами. В другой *in vitro* системе ингибитор протеинкиназ ставроспорин блокировал динеин-зависимое движение фагосом путем ингибирования белка, непосредственно связанного с динактином, предположительно протеинкиназы [14]. В обоих случаях регуляторные компоненты были локализованы вместе с динеин/динактин комплексом. Еще в одной работе динеин-зависимый транспорт подавлялся *in vivo* ставроспорином, что вызывало перераспределение везикул, содержащих МНС II класса (ранних лизосом) к периферии клетки [216]. Таким образом, из этих работ следует, что активация динеин-зависимого транспорта требует участия протеинкиназ.

Цитоплазматический динеин способен также связываться с другими протеинкиназами: с казеин киназой II и Fyn киназой [25, 85, 131]. Однако неизвестно, участвуют ли эти киназы в его регуляции или используют данный мотор для собственной доставки в места, где они участвуют в регуляции других клеточных процессов. Fyn киназа, тирозиновая киназа в src семействе, связывает легкую цепь динеина Tctex-1 [25, 85, 131]. Tctex-1 и Fyn колокализуются во время митоза в лимфоцитах. Из работы Кэмпбел [25] следует, что хотя Tctex-1 фосфорилируется Fyn киназой, она не является для нее основным субстратом. Авторы предполагают, что Fyn использует динеин для фосфорилирования других субстратов. Однако в опытах на электрическом органе *Torpedo* Fyn киназа фосфорилировала Tctex-1 *in vitro* и *in vivo*, что говорит о возможной регуляции активности динеина [131].

Казеиновая киназа II (СКII) связывает промежуточную цепь динеина и способна фосфорилировать промежуточную цепь и p150^{Glucd} *in vitro* [85]. Она была найдена в местах локализации динеина, включая центросому и веретено деления [94, 220]. Тем не менее остается не выясненным участвует ли СКII в регуляции динеина.

Миозины

Для миозинов, участвующих в транспорте органелл, также известны примеры регуляции активности при помощи фосфорилирования. Так, активность миозинов IA, IB и IC из *Acanthamoeba* увеличивалась *in vitro* при фосфорилировании по консервативным серину или треонину [62, 113, 117]. Эксперименты *in vivo* также свидетельствуют об увеличении активности миозина I из *Acanthamoeba* при фосфорилировании: большая часть миозина I, присутствующего в областях клетки с активными протрузией и эндоцитозом, специфически узнается антителами против фосфорилированного миозина I [8]. Протеинкиназы, специфически фосфорилирующие миозин I, были выделены из *Acanthamoeba* и *Dictyostelium* [62, 102]. Этим ферментом оказалась протеинкиназа тяжелой цепи миозина I (МНСК), представляющая собой мономерный фермент с молекулярным весом около 100 кДа. МНСК способна автофосфорилироваться, что приводит к увеличению ее активности примерно в 50 раз [21]. Автофосфорилирование киназы и последующее фосфорилирование миозина I дополнительно стимулируются кислыми фосфолипидами [21]. МНСК являются членами PAK/Ste20 семейства протеинкиназ [21, 103], которые участвуют в каскадной цепи после малых G-белков Ras и Cdc42. Протеинкиназы этого семейства играют роль в перестройке актинового цитоскелета, а также в фосфорилировании миозина VI и регуляции его уровня вблизи плазматической мембраны. После стимуляции фибробластов фактором роста EGF, миозин VI становился фосфорилированным в области головного домена и накапливался в переднем крае клетки [23]. Таким образом, миозины семейств I и VI регулируются протеинкиназами, находящимися в регуляторном каскаде после малых G-белков Ras и Cdc42.

Многие миозины существуют в виде фосфопротеинов. К примеру, миозин Va в норме связан с кальций/кальмодулин-зависимой киназой II и также является субстратом для фосфорилирования, хотя физиологическая роль такой модификации была установлена не сразу [34, 99]. Оказалось, что в меланофорах *Xenopus* фосфорилирование миозина Va этой протеинкиназой происходит во время митоза, что приводит к диссоциации моторного белка с поверхности меланосом [83, 164]. Ранее было показано, что при повышении концентрации кальция миозин Va также диссоциировал с поверхности синапсом из мозга крысы [154], однако, по-видимому, это не было связано с фосфорилированием, поскольку не зависело от АТФ. Недавно в лаборатории С. Кузнецова [214] были получены данные, указывающие на то, что регуляция миозина Va в митотическом экстракте *Xenopus* зависит от того, с какими органеллами он связан. Фосфорили-

рование этого мотора кальций/кальмодулин-зависимой киназой II ингибировало движение одних органелл вдоль актиновых филаментов и активировало движение других.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование миозинов, как и других моторных белков, является одним из основных способов регуляции и может оказывать разнонаправленное действие на их активность. Однако известны примеры регуляторного действия на моторы и других клеточных факторов, отличных от киназ и фосфатаз. Это в первую очередь малые G-белки и кальций-связывающий белок кальмодулин, представляющие собой важные компоненты систем проведения сигналов в клетках.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ МАЛЫХ G-БЕЛКОВ

Малые ГТФ-связывающие белки выполняют в клетках эукариот многообразные регуляторные функции. Обычно они участвуют в передаче сигналов и играют важную роль в таких процессах как организация актинового цитоскелета, пролиферация, апоптоз и мембранный транспорт. Эти белки совершают цикл между активной ГТФ-формой, в которой они могут связываться с различными белками-мишенями, и неактивной ГДФ-формой. Переход из одной формы в другую в свою очередь регулируется многочисленными клеточными факторами. Среди таких факторов различают ингибирующие белки, одни из которых активируют ГТФ-азную активность ГТФ-связывающих белков (GAP- GTPase activating proteins) и переводят их в неактивную ГДФ-форму, а другие – затрудняют в них замещение ГДФ на ГТФ (GDI – GDP dissociation inhibitor), и активирующие белки, которые вызывают обмен ГДФ на ГТФ (GEF – GDP/GTP exchange factor), переводя их тем самым в активную ГТФ-форму. G-белки размером от 20 до 25 кД разделяются на несколько подклассов: Ras, Rho, Rab, Arf и Ran. Мы уже упоминали, что некоторые G-белки участвуют в регуляции моторных белков, взаимодействуя с протеинкиназами. Однако известны случаи, когда они непосредственно связываются с моторными белками из семейств кинезинов и миозинов.

Так было показано, что Rab6, участвующий в транспорте от аппарата Гольджи к ЭР, взаимодействует с кинезино-подобным белком [43]. Этот новый мотор, получивший название рабкинезин-6, взаимодействует с Rab6 в ГТФ-связанной форме, и играет роль в динамике аппарата Гольджи. Экспрессия экзогенного рабкинезина-6 приводит к дисперсии аппарата Гольджи (похожее действие оказывает экспрессия Rab6). Ко-экспрессия Rab6 и С-концевого участка рабкинезина-6 частично подавляет дисперсию Гольджи, вызванную избытком Rab6. Таким образом, этот кинезин регулируется, по-видимому,

белком Rab6 и находится в каскадной регуляторной цепи после этого белка [43].

Другой G-белок, Rab5, регулирующий динамику прикрепления и слияния ранних эндосом, участвует также в регуляции взаимодействия эндосом с микротрубочками и их подвижности [142]. Этот белок стимулирует движение эндосом *in vitro* в направлении минус-концов микротрубочек. Причем это движение подавлялось антителами не к динеину, а к кинезину. Авторы считают, что в транспорте эндосом возможно задействован минус-концевой кинезин. Другое объяснение этих данных позволяет сделать недавняя работа из лаборатории В. Гельфанда [36], в которой показано, что кинезин II и динеин могут быть связаны с субъединицей P-150^{Glued} динактина и, являясь компонентами одного комплекса, регулироваться общими механизмами.

Малая ГТФ-аза ARF1 также участвует в регуляции транспорта везикул по микротрубочкам, хотя пока не выяснено, с какими моторными белками она связывается. Ее роль в транспорте белка паксиллина из аппарата Гольджи к периферии клетки была продемонстрирована при изучении процессов созревания клеточных фокальных контактов [144]. Таким образом, наиболее вероятным является активация этим белком одного из кинезинов.

Малые G-белки также способны связывать и регулировать моторы миозинового суперсемейства. Было показано, что Rab11a специфически взаимодействует с миозином Vb *in vitro* и колокализуется с миозином Vb на эндосомах в поляризованных и неполяризованных клетках [96].

Другой белок, Rab27a, колокализуется в пигментных клетках с меланосомами. Экспрессия доминантно-негативного мутанта Rab27a подавляла дисперсию и приводила к накоплению меланосом в околоядерной области клеток, свидетельствуя о регуляторной функции Rab27a [79]. Было показано, что белок меланофин способен одновременно связываться с Rab27a и миозином Va, а также может служить связующим звеном между ними [188].

Другим примером участия малых G-белков в регуляции транспорта является их взаимодействие с известными рецепторами моторных белков. Так было показано, что малые ГТФ-азы из семейства Rho-белков специфически связываются с кинектином [75]. Хотя пока неясно, каковы последствия такого связывания, представляется важным, что эти белки взаимодействуют с кинектином только в активной, ГТФ-связанной форме [5, 75].

В заключение можно сказать, что малые ГТФ-азы могут регулировать транспорт, используя различные механизмы. Во-первых, они

могут активировать протеинкиназы, которые, в свою очередь, фосфорилируют связанные с ними моторные белки. Во-вторых, они могут непосредственно взаимодействовать с моторными белками и связывать их с органеллами. И, в-третьих, образуя с ними комплекс, могут влиять на их активность.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ ДИНАКТИНА

Как ранее было сказано, динактин является большим белковым комплексом, необходимым для функционирования динеина [55, 173]. Считается, что связывание динеина с органеллами осуществляется через динактин, а точнее – его актиноподобный белок, образующий минифиламентную структуру (см. рис. 4). Но, вдобавок к функции прикрепления этого моторного белка к органеллам, динактин играет и другую регуляторную роль. Добавление динактина увеличивает среднее расстояние, на которое динеин может переместиться вдоль микротрубочек за один раз, т.е. его процессивность [88]. Скорость движения при этом остается постоянной и АТФ-азная активность динеина не меняется. Эффект связывают с тем, что субъединица p150^{Glued} динактина имеет центр связывания с микротрубочками и препятствует диссоциации всего комплекса в процессе движения. Эта субъединица динактина сама может являться объектом регуляции, так как показано ее фосфорилирование *in vivo* [49, 78, 210].

Важное значение этого белка в регуляции внутриклеточного транспорта недавно получило еще одно подтверждение. Как было сказано выше, субъединица p150^{Glued} динактина может связываться не только с промежуточной цепью динеина, но и с некаталитической субъединицей КАР кинезина II [36]. Таким образом, динактин может выполнять роль связующего звена в образовании динеин-кинезинового комплекса и участвовать в координации функционирования этих моторных белков.

V. РЕГУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР

Как уже отмечалось, цитоскелетные структуры, являясь путями или треками, вдоль которых происходит транспорт различных органелл, сами претерпевают многочисленные перестройки. В связи с этим важным является вопрос, как транспорт зависит от свойств микротрубочек и актиновых структур, или точнее, как свойства цитоскелетных структур отражаются на активности моторных белков. Здесь следует подчеркнуть, что влияние перестроек в актиновом цитоскелете на миозин-зависимый транспорт совсем не изучено. Можно только предполагать, что движение по таким структурам как

стресс-фибриллы, в которых актиновые филаменты имеют разную полярированность, имеет свои особенности по сравнению с движением по поляризованному актиновому пучку. Значительно лучше изучена роль микротрубочек во внутриклеточном транспорте свойства хотя и в этой области еще много неясного.

РОЛЬ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МИКРОТРУБОЧКАМИ

Структурные белки, ассоциированные с микротрубочками или MAP (microtubule-associated proteins), являются фибриллярными белками. Они обратимо связываются с микротрубочками, способствуя их полимеризации, придают им устойчивость против деполимеризующих воздействий, а также вызывают образование пучков [115]. Большинство этих белков, как например MAP2 и tau, обнаружены в нейронах, в то время как MAP4 встречается во многих клетках. Основная функция MAP – стабилизация микротрубочек, возможное участие их в регуляции транспорта пока вызывает споры.

Противоречивые данные были получены относительно эффектов, которые оказывали MAP на активность кинезина. Так, в опытах *in vitro* было показано, что MAP2 подавлял кинезин-зависимое скольжение микротрубочек по стеклу, а белок tau такого действия не оказывал [64, 111]. Однако, по данным других авторов tau подавлял способность микротрубочек активировать АТФазу кинезина [82]. Кроме того, в опытах *in vivo* фрагмент белка tau при экспрессии в клетках ингибировал транспорт органелл [197]. В ранних работах было показано, что MAP и кинезин имеют разные места связывания на микротрубочках [160], причем кинезин связывается с tau-содержащими микротрубочками с большим сродством [82]. Эти данные позволяют думать, что ингибиторный эффект на транспорт органелл не связан с созданием стерических помех. Другим аргументом в пользу регуляторного действия MAP являются данные о том, что экспрессия tau избирательно подавляла кинезин-зависимый транспорт везикул, митохондрий и эндоплазматического ретикула, не влияя при этом на динеин-зависимый транспорт [42].

Связывание MAP с микротрубочками может быть нарушено в результате их фосфорилирования специфической протеинкиназой [111]. В опытах *in vitro* это приводило к восстановлению динеин- и кинезин-зависимой подвижности [111]. В первичной культуре сенсорных нейронов фосфорилирование tau коррелировало со стимуляцией транспорта крупных органелл в аксонах под действием цАМФ [169]. Таким образом, ингибирующее действие MAP на транспорт органелл обратимо и зависит от фосфорилирования.

Другим регулятором сродства MAP к микротрубочкам является мапмодулин. Этот белок взаимодействует с MAP2, MAP4 и tau и, по-видимому, вызывает их диссоциацию с микротрубочек, что приводит к увеличению подвижности органелл в трансфецированных клетках в обоих направлениях [81]. Мапмодулин также стимулировал транспорт между эндосомами и транс-Гольджи в то время как MAP его ингибировали [198].

Подводя черту, можно сказать, что MAP вероятно играют не только структурную, но и регуляторную роль, хотя многое еще предстоит выяснить.

РОЛЬ ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРОТРУБОЧЕК

Как уже отмечалось, система микротрубочек состоит как из динамичных полимеров, постоянно находящихся в процессе сборки–разборки, так и более стабильных, время жизни которых составляют часы [22, 179]. Стабильные микротрубочки содержат в своем составе несколько типов пост-трансляционно модифицированного тубулина. Обнаружены полиглутамилированный и полиглицилированный тубулины [114], которые получаются в результате образования боковых изопептидных связей, а также α -тубулины – ацетилованный по Lys40 [100] и детирозилированный по C-концу [22]. Было показано, что сами по себе эти модификации не влияют на динамические свойства микротрубочек, но накапливаясь в долгоживущих полимерах, являются их удобными маркерами [211]. Предполагается, что различные модификации тубулина служат для специфического узнавания микротрубочек ассоциированными с ними белками и органеллами.

Действительно, еще в ранних работах из нескольких лабораторий была показана ко-локализация стабильных микротрубочек с промежуточными филаментами [59], митохондриями [24], аппаратом Гольджи [182] и транспортными везикулами между Гольджи и ЭР [128]. Однако, роль взаимодействия органелл со стабильными микротрубочками остается неясной. Например, в поддержании структуры и центральной локализации аппарата Гольджи вместе со стабильными участвуют и динамичные микротрубочки. Это становится очевидным, когда Гольджи диспергирует не только при полной разборке микротрубочек, но и при удалении только их динамичной части [127, 153] или стабилизации всех микротрубочек при помощи таксола [162].

Данные, накопленные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что для нормального функционирования различных клеток необходимы как стабильные так и динамичные микротрубочки. На клеточном уровне роль стабильных микротрубочек была показана

при росте аксонов [194] и направленном движении фибробластов [134]. В обоих случаях пучки стабильных микротрубочек, направленных в сторону переднего края, появлялись сразу же после индукции движения. Следует отметить, что дифференцировка различных типов клеток часто сопровождается появлением стабильных микротрубочек. Было высказано предположение, что их появление связано со специализацией в дифференцированных клетках типов транспорта [179].

К настоящему времени известно несколько примеров транспорта определенных органелл вдоль стабильных или динамичных микротрубочек. Так оказалось, что в линии гепатоцитов WIF-B транспорт везикул к базолатеральной мембране происходит вдоль стабильных микротрубочек, в то время как к апикальной мембране — по динамичным [153]. Это удалось показать при помощи соединения, избирательно разрушающего динамичные микротрубочки. Авторы предположили, что открытое ими явление лежит в основе координации и других типов внутриклеточного транспорта.

В другой работе исследовался транспорт специализированных органелл, меланосом, в ответ на внешние стимулы. Оказалось, что в меланофорах рыб агрегация и дисперсия меланосом происходят также по микротрубочкам разного типа [89]. Используя антитела к пост-трансляционно модифицированному тубулину, авторы заблокировали движение органелл от центра, причем центро-стремительное движение полностью сохранялось.

Еще одним примером избирательного транспорта вдоль стабильных микротрубочек может служить транспорт компонентов аппарата Гольджи в процессе дисперсии, когда разрушаются динамичные микротрубочки, а стабильные сохраняются. Участие в этом процессе кинезина [127] служит дополнительным тому подтверждением. Следует подчеркнуть, что динамичные микротрубочки, по-видимому, отвечают за центро-стремительный транспорт компонентов аппарата Гольджи в клетке, и это поддерживает его центральную локализацию. Недавно было показано, что митохондрии двигаются по динамичным микротрубочкам, причем это движение может быть направлено как к периферии клетки, так и к ее центру, а со стабильными микротрубочками связаны неподвижные митохондрии [1]. Таким образом видно, что различия в динамических свойствах микротрубочек могут быть использованы для определения направления транспорта определенных органелл. Следовательно свойства микротрубочек могут служить еще одним фактором регуляции внутриклеточного транспорта.

Каким образом органеллы узнают, по каким микротрубочкам им двигаться? Попытка ответить на этот вопрос была сделана в лаборатории Г. Гундерсена. В результате изучения средства кинезина к

различным микротрубочкам авторы показали, что этот моторный белок предпочтительнее связывается с детирозилированными полимерами [105].

Однако транспорт вдоль стабильных микротрубочек с участием кинезина был показан только для промежуточных филаментов [93] и рециклирующих эндосом [108], хотя известно, что этот белок отвечает и за транспорт других органелл. Можно предположить, что сходство кинезина к различным микротрубочкам также является объектом более тонкой регуляции.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ приведенных данных говорит о том, что в животных клетках используются самые разнообразные пути регуляции внутриклеточной подвижности. Система транспорта органелл чутко реагирует на сигналы, получаемые клеткой из внешней среды, используя для этого различные способы — от глобальных перестроек цитоскелетных сетей до тонкой регуляции ферментативной активности моторных белков. Многочисленные примеры тесного взаимодействия транспортной и сигнальной систем показывают эффективность этой регуляции.

Следует подчеркнуть, что в транспорте определенных органелл могут участвовать сразу несколько различных моторных белков, и одной из важных проблем, требующих дальнейшего исследования, является изучение координации их действия. Как ранее отмечалось, на одной и той же частице одновременно могут находиться не только разнонаправленные моторы, связанные с микротрубочками, но и миозины, осуществляющие транспорт по другому типу цитоскелетных структур. Пока неясно, каким образом движение частицы по микротрубочкам переключается на транспорт по актиновым филаментам. Недавнее открытие белкового комплекса, содержащего цитоплазматический динеин, динактин и кинезин II [36], может послужить примером подобной координации. Это первый пример такого комплекса, объединяющего в своем составе компоненты, ответственные за разнонаправленный транспорт по микротрубочкам и взаимодействие с актиновыми структурами. Каким образом определяется направление движения органелл по микротрубочкам? Что заставляет органеллы «перескакивать» с микротрубочек на актиновые филаменты и обратно? На эти вопросы должны ответить дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулик А.В., Гиоева Ф.К., Минин А.А. (2002) Онтогенез, **33**, 366–373.
2. Adams, R.J., Pollard, T.D. (1986) Nature, **322**, 754–756.
3. Adams, R.R., Tavares, A.A., Salzberg, A., Bellen, H.J., Glover, D.M. (1998) Genes Dev., **12**, 1483–1494.
4. Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M., Hirokawa, N. (1992) J. Cell Biol., **119**, 1287–1296.
5. Alberts, A.S., Bouquin, N., Johnston, L.H., Treisman, R. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 8616–8622.
6. Allan, V. (1995) J. Cell Biol., **128**, 879–891.
7. Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., Gruenberg, J. (1993) J. Cell Biol., **123**, 1373–1387.
8. Baines, I.C., Corigliano-Murphy, A., Korn, E.D. (1995) J. Cell Biol., **130**, 591–603.
9. Barton, N.R., Goldstein, L.S. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 1735–1742.
10. Berg, J.S., Powell, B.C., Cheney, R.E. (2001) Mol. Biol. Cell., **12**, 780–794.
11. Berliner, E., Young, E.C., Anderson, K., Mahtani, H., Gells, J. (1995) Nature, **373**, 718.
12. Bershadsky, A.D., Vasiliev, J.M. (1988) Cytoskeleton. Plenum Press, New York, 298.
13. Blangy, A., Lane, H.A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., Nigg, E.A. (1995) Cell, **83**, 1159–1169.
14. Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A., Griffiths, G. (1997) J. Cell Biol., **137**, 113–129.
15. Bloom, G.S., Wagner, M.C., Pfister, K.K., Brady, S.T. (1988) Biochemistry, **27**, 3409–3416.
16. Bloom, G., Goldstein, L. (1998) J. Cell Biol., **140**, 1277–1280.
17. Bloom, J.S. (1992) Cur. Opin. Cell Biol., **4**, 66–73.
18. Brady, S.T. (1985) Nature, **317**, 73–75.
19. Bridgman, P.S. (1999) J. Cell. Biol., **146**, 1045–1060.
20. Brown, S.S. (1999) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **15**, 63–80.
21. Brzeska, H., Lynch, T.J., Korn, E.D. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 3591–3594.
22. Bulinski, J.C., Gundersen, G.G. (1991) BioEssays, **13**, 285–293.
23. Buss, F., Kendrick-Jones, J., Lionne, C., Knight, A.E., Cote, G.P., Paul Luzio, J. (1998) J. Cell Biol., **143**, 1535–1545.
24. Cambray-Deakin, M.A., Robson, S.J., Burgoyne, R.D. (1988) Cell Motil. Cytoskeleton, **10**, 438–449.
25. Campbell, K.S., Cooper, S., Dessing, M., Yates, S., Buder, A. (1998) J. Immunol., **161**, 1728–1737.
26. Carmena, M., Riparbelli, M.G., Minestrini, G., Tavares, A.M., Adams, R., Callaini, G., Glover, D.M. (1998) J. Cell Biol., **143**, 659–671.
27. Catlett, N.L., Weisman, L.S. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 394–399.
28. Cheney, R.E., Riley, M.A., Mooseker, M.S. (1993) Cell Motil. Cytoskeleton, **24**, 215–223.
29. Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E., Mooseker, M.S. (1993) Cell, **75**, 13–23.
30. Cleveland, D.W., Hoffman, P.N. (1991) Cell, **67**, 453–456.
31. Colledge, M., Scott, J.D. (1999) Trends Cell Biol., **9**, 216–221.

32. Coluccio, L.M. (1997) *J. Physiol.*, **273**, 347–359.
33. Cortesy-Theulaz, I., Pauloin, A., Pfeffer, S.R. (1992) *J. Cell Biol.*, **118**, 1333–1345.
34. Costa, M.C., Mani, F., Santoro, W., Espreafico, E.M., Larson, R.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 15811–15819.
35. Criswell, P.S., Ostrowski, L.E., Asai, D.J. (1996) *J. Cell Sci.*, **109**, 1891–1898.
36. Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Vaughan, P.S., Fanarraga, M.L., Vernos, I., Vaughan, K.T., Gelfand, V.I. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 297–301.
37. Dell'Acqua, M.L., Scott, J.D. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12881–12884.
38. Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., Walczak, C.E. (1999) *Cell*, **96**, 69–78.
39. Dillman, J.F., Dabney, L.P., Pfister, K.K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 141–144.
40. Dillman, J.F., Pfister, K.K. (1994) *J. Cell Biol.*, **127**, 1671–1681.
41. Dillman, J.F., Pfister, K.K. (1995) *Biophys. J.*, **68**, Suppl 226S.
42. Ebner, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 777–794.
43. Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., Goud, B. (1998) *Science*, **279**, 580–585.
44. Echeverri, C.J., Paschal, B.M., Vaughan, K.T., Vallee, R.B. (1996) *J. Cell Biol.*, **132**, 617–633.
45. Endow, S.A. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **262**, 12–18.
46. Endow, S.A., Henikoff, S., Soler, Niedziela L. (1990) *Nature*, **345**, 81–83.
47. Eshel, D., Urrestarazu, L.A., Vissers, S., Jauniaux, J.C., van Vliet-Reedijk, J.C., Planta, R.J., Gibbons, I.R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11172–11176.
48. Evans, L.L., Lee, A.J., Bridgman, P.C., Mooseker, M.S. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 2055–2066.
49. Farshori, P., Holzbaur, P.L. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232**, 810–816.
50. Fath, K.R., Trimbaur, G.M., Burgess, D.R. (1994) *J. Cell Biol.*, **126**, 661–675.
51. Gho, M., McDonald, K., Ganetzky, B., Saxton, W.M. (1992) *Science*, **258**, 313–316.
52. Gibbons, B.H., Asai, D.J., Tang, W.-J.Y., Hays, T.S., Gibbons, I.R. (1994) *Mol. Biol. Cell*, **5**, 57–70.
53. Giet, R., Uzbekov, R., Cubizolles, F., Le Guellec, K., Prigent, C. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 15005–15013.
54. Gill, S.R., Cleveland, D.W., Schroer, T.A. (1994) *Mol. Biol. Cell*, **5**, 645–654.
55. Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P., Cleveland, D.W. (1991) *J. Cell Biol.*, **115**, 1639–1650.
56. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. (1999) / Eds. T. Kreis and R. Vale. Oxford University Press Inc., New York.
57. Gundersen, G.G., Kalnoski, M.H., Bulinski, J.C. (1984) *Cell*, **38**, 779–789.
58. Gundersen, G.G., Kim, I., Chapin, C.J. (1994) *J. Cell Sci.*, **107**, 645–659.
59. Gurland, G., Gundersen, G.G. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1275–1290.
60. Hall, D.H., Hedgecock, E.M. (1991) *Cell*, **65**, 837–847.
61. Hamm-Alvarez, S.F., da Costa, S.R., Sonee, M., Warren, D.W., Mircheff, A.K. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **438**, 177–180.
62. Hammer, J.A., Albanesi, J.P., Korn, E.D. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 10168–10175.
63. Hasson, T., Mooseker, M.S. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 587–594.

64. Heins, S., Song, Y.H., Wille, H., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (1991) *J. Cell Sci.*, **14**, 121–124.
65. Herman, I.M., Crisona, N.J., Pollard, T.D. (1981) *J. Cell Biol.*, **90**, 84–91.
66. Hirokawa, N. (1993) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**, 724.
67. Hirokawa, N. (1996) *Trends Cell Biol.*, **6**, 135.
68. Hirokawa, N. (1998) *Science*, **279**, 519–526.
69. Hirokawa, N., Pfister, K.K., Yorifuji, H., Wagner, M.C., Brady, S.T., Bloom, G.S. (1989) *Cell*, **56**, 867–878.
70. Hirokawa, N., Sato Yoshitake, R., Kobayashi, N., Pfister, K.K., Bloom, G.S., Brady, S.T. (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 295–302.
71. Hollenbeck, P.J. (1993) *J. Neurochem.*, **60**, 2265–75.
72. Hollenbeck, P.J., Swanson, J.A. (1990) *Nature*, **346**, 864–866.
73. Holleran, E.A., Tokito, M.K., Karki, S., Holzbaur, E.L. (1996) *J. Cell Biol.*, **135**, 1815–1829.
74. Holzbaur, E.L., Vallee, R.B. (1994) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 338.
75. Hotta, K., Tanaka, K., Mino, A., Kohno, H., Takai, Y. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 69–74.
76. Howard, J. (1997) *Nature*, **389**, 561–567.
77. Huang, J.D., Brady, S.T., Richards, B.W., Stenolen, D., Resau, J.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1999) *Nature*, **397**, 267–270.
78. Huang, C.Y., Chang, C.P., Huang, C.L., Ferrell, J.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14262–14269.
79. Hume, A.N., Collinson, L.M., Rapak, A., Gomes, A.Q., Hopkins, C.R., Seabra, M.C. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 795–808.
80. Huyet, A., Kahana, J., Silver, P., Zeng, X., Saunders, W.S. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 295–301.
81. Itin, C., Ulitzur, N., Muhlbauer, B., Pfeffer, S.R. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2191–2197.
82. Jancsik, V., Filliol, D., Rendon, A. (1996) *Neurobiology*, **4**, 417–429.
83. Karcher, R.L., Roland, J.T., Zapacosta, F., Huddleston, M.J., Annan, R.S., Carr, S.A., Gelfand, V.I. (2001) *Science*, **293**, 1317–1320.
84. Karki, S., Holzbaur, E.L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 28806–28811.
85. Karki, S., Tokito, M.K., Holzbaur, E.L. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 5887–5891.
86. Karsenti, E., Boleti, H., Vernos, I. (1996) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **7**, 367–378.
87. Khodyakov, A., Lisunova, E.M., Minin, A.A., Koonce, M.P., Gyoeva, F.K. (1998) *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 333–343.
88. King, S.J., Schroer, T.A. (2000) *Nature Cell Biol.*, **2**, 20–24.
89. Klotz, A., Rutberg, M., Denoulet, P., Wallin, M. (1999) *Cell Motil. Cytoskeleton*, **44**, 263–273.
90. Kondo, S., Sato Yoshitake, R., Noda, Y., Aizawa, H., Nakata, T., Matsuura, Y., Hirokawa, N. (1994) *J. Cell Biol.*, **125**, 1095–1107.
91. Koonce, M.P., Grissom, P.M., McIntosh, J.R. (1992) *J. Cell Biol.*, **119**, 1597.
92. Koonce, M.P., Samsó, M. (1996) *Mol. Biol. Cell*, **7**, 935–948.
93. Kreitzer, G., Liao, G., Gundersen, G.G. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1105–1118.
94. Krek, W., Maridor, G., Nigg, E.A. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 143–155.
95. Krendel, M., Sgourdas, G., Bonder, E.M. (1998) *Cell Motile. Cytoskel.*, **40**, 368–378.

96. Kumar, R., Navarre, J., Goldenring, J.R. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 944a.
97. Kuznetsov, S.A., Langford, G.M., Weiss, D.G. (1992) *Nature*, **356**, 722–725.
98. Lafont, F., Burkhardt, J.K., Simons, K. (1994) *Nature*, **372**, 801–803.
99. Larson, R.E., Espindola, F.S., Espreafico, E.M. (1990) *J. Neurochem.*, **54**, 1288–1294.
100. LeDizet, M., Piperno, G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5720–5724.
101. Lee, K.D., Hollenbeck, P.J. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5600–5605.
102. Lee, S.F., Cote, G.P. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 11776–11782.
103. Lee, S.F., Egelhoff, T.T., Mahasneh, A., Cote, G.P. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 27044–27048.
104. Leibler, S., Huse, D.A. (1993) *J. Cell Biol.*, **121**, 1357–1368.
105. Liao, G., Gundersen, G.G. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 9797–9803.
106. Liao, H., Li, G., Yen, T.J. (1994) *Science*, **265**, 5170, 394–398. ??
107. Lin, S.X., Ferro, K.L., Collins, C.A. (1994) *J. Cell Biol.*, **127**, 1009–1019.
108. Lin, S.X., Gundersen, G.G., Maxfield, F.R. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 96–109.
109. Lindesmith, L., McIlvain, J.M., Argon, Y., Sheetz, M.P. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22929–22933.
110. Lippincott-Schwartz, J., Cole, N.B., Marotta, A., Conrad, P.A., Bloom, G.S. (1995) *J. Cell Biol.*, **128**, 293.
111. Lopez, L.A., Sheetz, M.P. (1993) *Cell Motil. Cytoskeleton*, **24**, 1–16.
112. Lye, J., Porter, M.E., Scholey, J.M., McIntosh, J.R. (1987) *Cell*, **51**, 309.
113. Lynch, T.J., Brzeska, H., Miyata, H., Korn, E.D. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 19333–19339.
114. MacRae, T.H. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **244**, 265–278.
115. Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 72–81.
116. Marlowe, K.J., Farshori, P., Torgerson, R.R., Anderson, K.L., Miller, L.J., McNiven, M.A. (1998) *Eur. J. Cell Biol.*, **75**, 140–152.
117. Maruta, H., Korn, E.D. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 8329–8332.
118. McDonald, H.B., Goldstein, L.S. (1990) *Cell*, **61**, 991–1000.
119. McDonald, H.B., Stewart, R.J., Goldstein, L.S. (1990) *Cell*, **63**, 1159–1165.
120. McIlvain, J.M., Burkhardt, J.K., Hamm-Alvarez, S., Argon, Y., Sheetz, M.P. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 19176–19182.
121. Meluh, P.B., Rose, M.D. (1990) *Cell*, **60**, 1029.
122. Merdes, A., Cleveland, D.W. (1997) *J. Cell Biol.*, **138**, 953–956.
123. Mermall, V., McNally, J.G., Miller, K.G. (1994) *Nature*, **369**, 560–562.
124. Mermall, V., Miller, K.G. (1995) *J. Cell Biol.*, **129**, 1575–1588.
125. Mikami, A., Paschal, B.M., Mazumdar, M., Vallee, R.B. (1993) *Neuron*, **10**, 787.
126. Milisav, I. (1998) *Cell Motil. Cytoskel.*, **39**, 261–272.
127. Minin, A.A. (1997) *J. Cell Sci.*, **110**, 2495–2505.
128. Mizuno, M., Singer, S.J. (1994) *J. Cell Sci.*, **107**, 1321–1331.
129. Mochly-Rosen, D. (1995) *Science*, **268**, 247–251.
130. Morris, R.L., Hollenbeck, P.J. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1315–1326.
131. Mou, T., Kraas, J.R., Fung, E.T., Swope, S.L. (1998) *FEBS Lett.*, **435**, 275–281.

132. Muresan, V., Godek, C.P., Reese, T.S., Schnapp, B.J. (1996) *J. Cell Biol.*, **135**, 383–397.
133. Musch, A., Cohen, D., Rodriguez-Boulan, E. (1997) *J. Cell Biol.*, **138**, 291–306.
134. Nagasaki, T., Liao, G., Gundersen, G.G. (1994) *J. Cell Sci.*, **107**, 3413–3423.
135. Nakagawa, T., Tanaka, Y., Matsuoka, E., Kondo, S., Okada, Y., Noda, Y., Kanai, Y., Hirokawa, N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9654–9659.
136. Nakata, T., Hirokawa, N. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1039–1053.
137. Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., Hirokawa, N. (1994) *Cell*, **79**, 1209–1220.
138. Nascimento, A.A., Cheney, R.E., Tauhata, S.B., Larson, R.E., Mooseker, M.S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 17561–17569.
139. Navone, F., Niclas, J., Hom-Booher, N., Sparks, L., Bernstein, H.D., McCaffrey, G., Vale, R.D. (1992) *J. Cell Biol.*, **117**, 1263–1275.
140. Neely, M.D., Erickson, H.P., Boekelheide, K. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 8691–8698.
141. Niclas, J., Navone, F., Hom-Booher, N., Vale, R.D. (1994) *Neuron*, **12**, 1059.
142. Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A., Zerial, M. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 376–382.
143. Nobes, C.D., Hall, A. (1995) *Cell*, **81**, 53.
144. Norman, J.C., Jones, D., Barry, S.T., Holt, M.R., Cockcroft, S., Crotchley, D.R. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 1981–1995.
145. Oda, H., Stockert, R.J., Collins, C., Wang, H., Novikoff, P.M., Satir, P., Wolkoff, A.W. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 15242–15249.
146. Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine, Y., Hirokawa, N. (1995) *Cell*, **81**, 769.
147. Otsuka, A.J., Jeyapakash, A., Garcia-Anoveros, J., Tang, L.Z., Fisk, G., Hartshorne, T., Franco, R., Born, T. (1991) *Neuron*, **6**, 113–122.
148. Paschal, B.M., Shpetner, H.S., Vallee, R.B. (1987) *J. Cell Biol.*, **105**, 1273.
149. Pereira, A.J., Dalby, B., Stewart, R.J., Doxsey, S.J. (1997) *J. Cell Biol.*, **136**, 1081–1090.
150. Pfarr, C.M., Coue, M., Grissom, P.M., Hays, T.S., Porter, M.E., McIntosh, J.R. (1990) *Nature*, **345**, 263–265.
151. Pfister, K.K., Salata, M.W., Dillman, J.F., Vaughan, K.T., Vallee, R.B., Torre, E., Lye, R.J. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 1687–1694.
152. Pollard, T.D. (1990) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2**, 33–40.
153. Pous, C., Chabin, K., Drechou, A., Barbot, L., Phung Koskas, T., Settegrana, C., Bourguet Kondracki, M.L., Maurice, M., Cassio, D., Guyot, M., Durand, G. (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 153–165.
154. Prekeris, R., Terrian, D.M. (1997) *J. Cell Biol.*, **137**, 1589–1601.
155. Provance, D.J., Wei, M., Ipe, V., Mercer, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14554–14558.
156. Reck-Peterson, S.L., Novick, P.J., Mooseker, M.S. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1001–1017.
157. Reilein, A.R., Rogers, S.L., Tuma, M.C., Gelfand, V.I. (2001) *Int. Rev. Cytol.*, **204**, 179–238.
158. Ridley, A., Paterson, H.F., Johnston, C., Diekmann, D., Hall, A. (1992) *Cell*, **70**, 401.
159. Rieder, C.L., Salmon, E.D. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 223–233.
160. Rodionov, V.I., Gyoeva, F.K., Kashina, A.S., Kuznetsov, S.A., Gelfand, V.I. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 5702–5707.

161. *Rodionov, V., Hope, A., Svitkina, T., Borisy, G.* (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 165–168.
162. *Rogalski, A.A., Singer, S.J.* (1984) *J. Cell Biol.*, **99**, 1092–1100.
163. *Rogers, S.L., Gelfand, V.I.* (1998) *Curr. Biol.*, **8**, 161–164.
164. *Rogers, S.L., Karcher, R.L., Roland, J.T., Minin, A.A., Steffen, W., Gelfand, V.I.* (1999) *J. Cell Biol.*, **146**, 1265–1276.
165. *Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M., Prigent, C.* (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 557–572.
166. *Runnegar, M.T., Wei, X., Hamm-Alvarez, S.F.* (1999) *Biochem. J.*, **342**, 1–6.
167. *Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S., Hirokawa, N.* (1997) *Neuron*, **18**, 425–438.
168. *Satir, P.* (1965) *J. Cell Biol.*, **26**, 805–834.
169. *Sato-Harada, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Hirokawa, N.* (1996) *Cell Struct. Funct.*, **21**, 283–295.
170. *Sato-Yoshitake, R., Yorifuji, H., Inagaki, M., Hirokawa, N.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23930–23936.
171. *Saunders, W., Lengyel, V., Hoyt, M.A.* (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1025–1033.
172. *Sawin, K.E., Mitchison, T.J.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4289–4293.
173. *Schafer, D.A., Gill, S.R., Cooper, J.A., Heuser, J.E., Schroer, T.A.* (1994) *J. Cell Biol.*, **126**, 403–412.
174. *Schnapp, B.J., Reese, T.S.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1548–1552.
175. *Schnapp, B.J., Vale, R.D., Sheetz, M.P., Reese, T.S.* (1985) *Cell*, **40**, 176. *Schott, D., Ho, J., Pruyn, D., Bretscher, A.* (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 791–808.
177. *Schroer, T.A.* (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 69.
178. *Schroer, T.A., Steuer, E.R., Sheetz, M.P.* (1989) *Cell*, **56**, 937–946.
179. *Schulze, E., Kirschner, M.* (1988) *Nature*, **334**, 356–359.
180. *Sekine, Y., Okada, Y., Noda, Y., Kondo, S., Aizawa, H., Takemura, R., Hirokawa, N.* (1994) *J. Cell Biol.*, **127**, 187–201.
181. *Sharp, D.J., McDonald, K.L., Brown, H.M., Matthies, H.J., Walczak, C., Vale, R.D., Mitchison, T.J., Scholey, J.M.* (1999) *J. Cell Biol.*, **144**, 125–138.
182. *Skoufias, D.A., Burgess, T.L., Wilson, L.* (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 1929–1937.
183. *Small, J.V.* (1988) *Electron Microsc. Rev.*, **1**, 155–174.
184. *Small, J.V., Rottner, K., Kaverina, I.* (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 54–60.
185. *Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K.T., Vallee, R.B., Holzbaur, E.L., Weiss, D.G., Kuznetsov, S.A.* (1997) *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2077–2088.
186. *Steuer, E.R., Wordeman, L., Schroer, T.A., Sheetz, M.P.* (1990) *Nature*, **345**, 266–268.
187. *Stow, J.L., Fath, K.R., Burgess, D.R.* (1998) *Trends Cell Biol.*, **8**, 138–141.
188. *Strom, M., Hume, A.N., Tarafder, A.K., Barkagianni, E., Seabra, M.C.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 25423–25430.
189. *Summers, K.E., Gibbons, I.R.* (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 3092–3096.
190. *Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., Borisy, G.G.* (1995) *J. Struct. Biol.*, **115**, 290–303.

191. *Tabb, J.S., Molyneaux, B.J., Cohen, D.L., Kuznetsov, S.A., Langford, G.M.* (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 3221–3234.
192. *Takagishi, Y., Oda, S., Hayasaka, S., Dekker-Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M., Yamamura, H.* (1996) *Neurosci. Lett.*, **215**, 169–172.
193. *Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., Hirokawa, N.* (1998) *Cell*, **93**, 1147–1158.
194. *Tanaka, E., Ho, T., Kirschner, M.W.* (1995) *J. Cell Biol.*, **128**, 139–155.
195. *Tanaka, Y., Zhang, Z., Hirokawa, N.* (1995) *J. Cell Sci.*, **108**, 1883–1893.
196. *Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., Vale, R.D.* (2002) *Science*, **297**, 2263–2267.
197. *Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E.* (1999) *J. Cell Sci.*, **112**, 2355–2367.
198. *Ulitzur, N., Humbert, M., Pfeffer, S.R.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5084–5089.
199. *Vaisberg, E.A., Grissom, P.M., McIntosh, J.R.* (1996) *J. Cell Biol.*, **133**, 831–842.
200. *Vaisberg, E.A., Koonce, M.P., McIntosh, J.R.* (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 849–858.
201. *Vale, R.D., Fletterick, R.J.* (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 745–777.
202. *Vale, R.D., Funatsu, T., Pierce, D.W., Romberg, L., Harada, Y., Yanagida, T.* (1996) *Nature*, **380**, 451.
203. *Vale, R.D., Reese, T.S., Sheetz, M.S.* (1985) *Cell*, **42**, 39.
204. *Vallee, R.B., Wall, J.S., Paschal, B.M., Shpetner, H.S.* (1988) *Nature*, **332**, 561–563.
205. *Vaughan, K.T., Vallee, R.B.* (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 1507–1516.
206. *Verde, F., Berrez, J.-M., Antony, C., Karsenti, E.* (1991) *J. Cell Biol.*, **112**, 1177–1187.
207. *Vernos, I., Karsenti, E.* (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 4–9.
208. *Wade, R.H., Chretien, D., Job, D.* (1990) *J. Mol. Biol.*, **212**, 775–786.
209. *Wang, S.-Z., Adler, R.* (1995) *J. Cell Biol.*, **128**, 761–768.
210. *Waterman-Storer, C.M., Karki, S., Holzbaue, E.L.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1634–1638.
211. *Webster, D.R., Wehland, J., Weber, K., Borisy, G.G.* (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 113–22.
212. *Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A., Sweeney, H.L.* (1999) *Nature*, **401**, 505–508.
213. *Wittmann, T., Waterman-Storer, C.M.* (2002) *J. Cell Sci.*, **114**, 1–9.
214. *Wollert, T., Weiss, D.G., Gerdes, H.H., Kuznetsov, S.A.* (2002) *J. Cell Biol.*, **159**, 571–577.
215. *Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., Hammer, J.A.* (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 1899–1918.
216. *Wubbolts, R., Fernandez Borja, M., Jordens, I., Reits, E., Dusseljee, S., Echeverri, C., Vallee, R.B., Neeffjes, J.* (1999) *J. Cell Sci.*, **112**, 785–795.
217. *Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., Hirokawa, N.* (1995) *J. Cell Biol.*, **130**, 1387–1399.
218. *Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., Hirokawa, N.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8443.
219. *Yang, J.T., Laymon, R.A., Goldstein, L.S.* (1989) *Cell*, **56**, 879.
220. *Yu, I.J., Spector, D.L., Bae, Y.S., Marshak, D.R.* (1991) *J. Cell Biol.*, **114**, 1217–32.
221. *Zecevic, M., Catling, A.D., Eblen, S.T., Renzi, L., Hittle, J.C., Yen, T.J., Gorbsky, G.J., Weber, M.J.* (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 1547–1558.

222. Zhang, Z., Tanaka, Y., Nonaka, S., Aizawa, H., Kawasaki, H., Nakata, T., Hirokawa, N. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 7928.
223. Zhao, L.P., Koslovsky, J.S., Reinhard, J., Bahler, M., Witt, A.E. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 10826–10831.