

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ, ФУНКЦИЯ И ДИНАМИКА ЯДЕРНЫХ ПОР

© Н. В. Губанова,¹ К. Н. Морозова, Е. В. Киселева²

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;
электронный адрес: ¹ nat@bionet.nsc.ru; ² elka@bionet.nsc.ru*

В обзоре суммированы последние данные морфологического и биохимического анализа ядерных пор — сложных структурных комплексов, через которые осуществляется пассивный и активный ядерно-цитоплазматический транспорт в эукариотической клетке. Рассмотрены особенности строения ядерных пор у низших и высших эукариот, молекулярные аспекты процессов импорта молекул в ядро и их экспорта в цитоплазму, а также факторы, участвующие в регуляции этого процесса. Особое внимание в обзоре уделено вопросу формирования ядерных поровых комплексов *in vitro* и *in vivo* в митозе.

Ключевые слова: ядерные поры, ядерно-цитоплазматический транспорт, динамика ядерных пор, митоз.

Принятые сокращения: ЯПК — ядерный поровый комплекс, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, ГТФ — гуанозинтрифосфат.

Появление ядерной оболочки в клетках эукариот обеспечило разделение процессов репликации и транскрипции ДНК, происходящих в ядре, от процессов синтеза белков в цитоплазме, что обеспечило более точные механизмы регуляции экспрессии генов. Особую роль в процессе взаимодействия ядра и цитоплазмы играют ядерные поровые комплексы (ЯПК), которые входят в состав ядерной оболочки. Интерес к устройству и механизмам функционирования ЯПК не снижается, несмотря на большое количество исследований и работ, посвященных этой теме. Благодаря динамическим изменениям в различных компартаментах ЯПК обеспечивают как пассивный, так и активный перенос мелких и крупных молекул, размер которых значительно превышает диаметр канала, через который осуществляется транспорт. В связи с этим исключительное значение имеет исследование ультраструктурного строения ЯПК как в неактивном состоянии, так и на разных этапах транспорта молекул. Не менее интересным является вопрос о селективности транспортируемых молекул. Благодаря молекулярно-биологическим исследованиям к настоящему времени удалось выявить особые последовательности в белках ЯПК, которые взаимодействуют с транспортными факторами и определяют направление перемещения транспортируемых молекул в ядро или в цитоплазму. Являясь сложноорганизованной структурой, ядерные поры тем не менее способны быстро собираться и разбираться, что предполагает наличие особых механизмов регуляции этих процессов, которые были изучены благодаря использованию комбинации различных методов.

Целью настоящего обзора является освещение основных результатов, полученных к настоящему времени по вышеперечисленным вопросам, а также обсуждение различных точек зрения, касающихся строения, функционирования и формирования ЯПК.

Ультраструктурная организация ядерных пор

Ядерно-цитоплазматическая активность клеток обеспечивается во многом транспортом различных регуляторных факторов, белков и РНК через ЯПК, поэтому исследованию морфологии этой органеллы уделяется большое внимание. Ядерная пора представляет собой сложное надмолекулярное образование диаметром около 120 нм и мол. массой около 125 мДа, формирующее 30-нанометровый канал в ядерной оболочке (Akey, Radermacher, 1993). ЯПК проявляет восьмикратную симметрию и состоит из набора 30 разных белков — нуклеопоринов (Vasu, Forbes, 2001; Cronshaw et al., 2002). Всего ядерная пора содержит около 1000 белков и включает в себя три основных компартамента: центральный и два асимметричных периферических — цитоплазматический и внутриядерный (Hinshaw et al., 1992; Ris, 1997).

Цитоплазматический компартимент находится над и непосредственно в плоскости наружной ядерной мембраны и состоит из тонкого и звездчатого горизонтальных колец (рис. 1, а, б, д). Тонкое кольцо имеет толщину около 20 нм и несет восемь субъединиц размером около 30 нм, к каждой из которых прикреплена направленная в цитоплазму короткая цитоплазматическая фибрилла. Цитоплазматические субъединицы сидят на тонком кольце, как бусы на нитке, и могут вращаться, приближая либо ударяя фибриллы от входа в канал поры (Goldberg, Allen, 1996; Kiseleva et al., 1998, 2000). Звездчатое кольцо находится под тонким кольцом, тесно связано с наружной мембраной ядра и содержит восемь трехгранных выростов, располагающихся между цитоплазматическими субъединицами. Принадлежность к цитоплазматическому компартименту еще одной структуры — периферической глобулы, закрывающей вход в центральный канал со стороны цитоплазмы (на рис. 1, д не показана), —

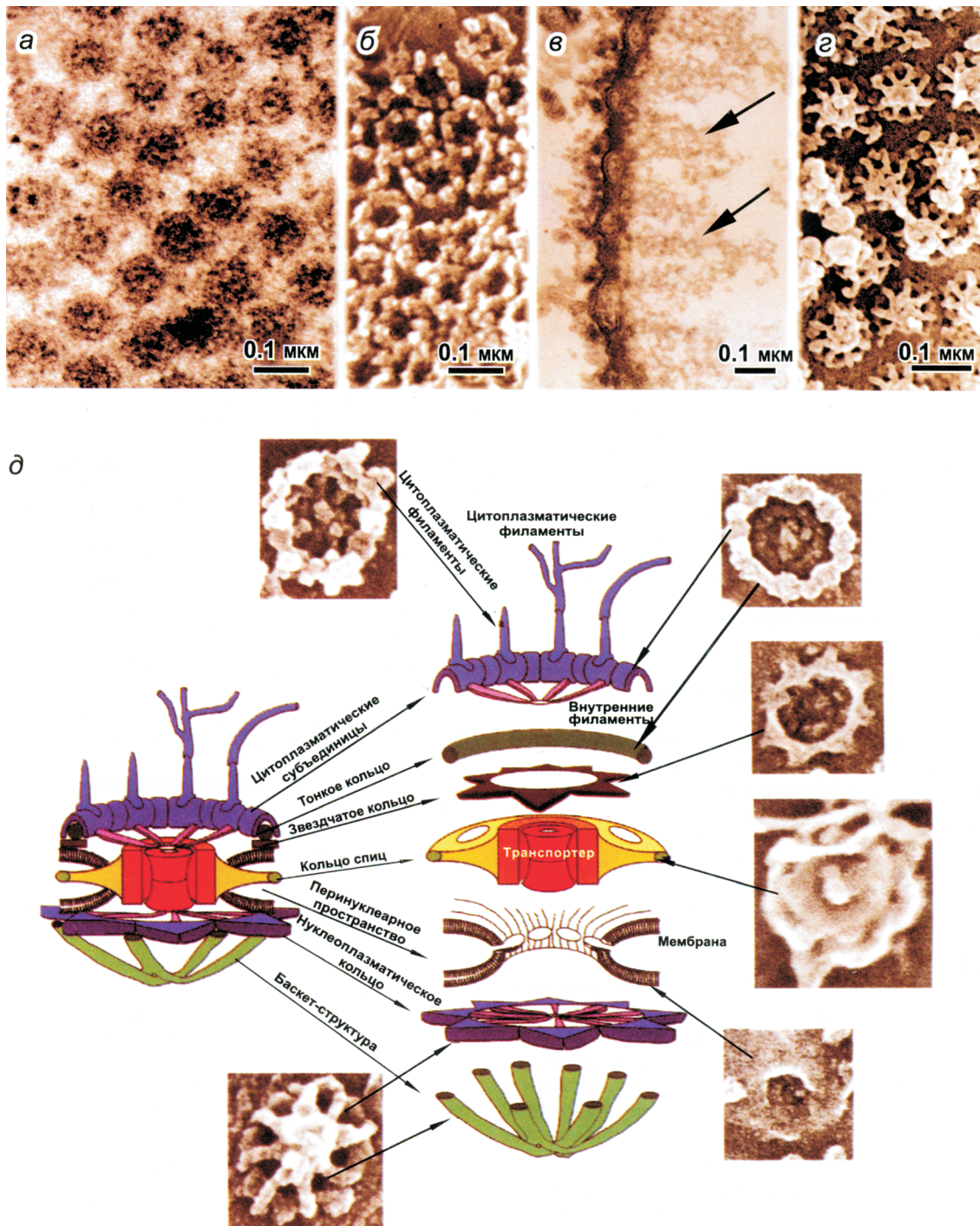


Рис. 1. Морфология ядерных поровых комплексов и схема структурной организации индивидуальных компонентов ядерной поры (модифицирована из: Allen et al., 2000).

a — вид цитоплазматического компартмента ядерных пор ооцитов *Xenopus* в просвечивающем электронном микроскопе; *b* — вид цитоплазматического компартмента ядерной поры того же объекта в сканирующем электронном микроскопе; *c* — поперечный срез через ядерную оболочку, демонстрирующий basket-структуры ядерных пор (отмечены стрелками) ооцитов *Xenopus* в просвечивающем электронном микроскопе; *d* — basket-структуры ядерных пор того же объекта в сканирующем электронном микроскопе; *d* — схема организации ядерной поры и фотографии ее индивидуальных компонентов, полученные с использованием сканирующего электронного микроскопа.

до сих пор обсуждается. В наших исследованиях (Kiseleva et al., 1998), посвященных изучению динамики ядерных пор в процессе экспорта РНК в клетках слонных желез хирономуса, было показано, что периферическая глобула остается связанной с ЯПК в процессе транспорта молекул.

Центральный компартмент является наиболее массивной частью ЯПК, формирует центральный канал поры и состоит из двух симметричных частей (рис. 1, *d*). Каждая из них включает в себя фрагмент цилиндрического транспортера и два кольца — внутреннее и трансмембранное, которое пронизывает ядерную мембрану и

служит связующим звеном в системе спиц. Эти кольца соединяют периферические компартменты ЯПК посредством вертикальных спиц и обеспечивают, вероятно, согласованное функционирование поры в процессе транспорта молекул. Центральный канал ЯПК, расположенный внутри транспортера, может либо расширяться от 10 нм в неактивном состоянии до 26 нм и более (Kiseleva et al., 1998; Pante, Kann, 2002), либо сужаться за счет изменения расстояния между соседними субъединицами транспортера и внутреннего кольца. Считается, что пора имеет периферические каналы диаметром около 5 нм между составляющими ее компартментами, через которые могут диффундировать небольшие молекулы (Kiseleva et al., 2000). Согласно данным электронной микроскопии, кольцо спиц ядерной поры контактирует с ламиной — сетью промежуточных филаментов, подстилающей внутреннюю мембрану ядра (Akey, 1989; Goldberg, Allen, 1996).

Внутриядерный компартмент ЯПК располагается под внутренней ядерной мембраной и состоит из внутриядерного кольца диаметром 120 нм, которое тесно контактирует с мембраной и содержит восемь трехгранных субъединиц. Они располагаются между отходящими от кольца 10-нанометровыми филаментами, формирующими basket-структуру (рис. 1, в, з). В неактивной ядерной поре фибриллы basket закрывают вход в пору, а в активной поре они формируют дополнительное «терминальное» кольцо диаметром около 50 нм (Goldberg, Allen, 1993; Kiseleva et al., 1996).

Сравнительный электронно-микроскопический анализ показал, что ЯПК являются консервативными структурами и имеют сходную организацию у высших животных и растений. Плотность расположения пор в ядерной оболочке варьирует в среднем от 13 до 30 пор на 1 мкм² ядерной оболочки и достигает от 3000 до 5000 пор на одно ядро в клетках млекопитающих, насекомых и амфибий (Maul, 1977; Kiseleva et al., 1998). Предполагается, что ядерные поры являются универсальными органеллами и каждая пора может обеспечивать транспорт молекул как в ядро, так и в цитоплазму. Изменение числа поровых комплексов в ядерной оболочке высших эукариот может происходить при изменении функционального состояния клеток за счет их образования *de novo* (Bucci, Wente, 1997; Maul, 1977). В то же время из-за тесной связи с ламиной ЯПК высших эукариот не могут изменять свое местоположение в ядерной оболочке. В отличие от высших эукариот низшие, например дрожжи, не имеют ламины. По этой причине ядерные поры дрожжей могут свободно перемещаться вдоль ядерной оболочки, а их плотность в различных участках оболочки может существенно изменяться (Belgareh, Doye, 1993). Тонкое строение ЯПК дрожжей было исследовано относительно недавно (Yang et al., 1998; Kiseleva et al., 2004a, 2004b). Было показано, что диаметр пор низших эукариот составляет около 100 нм, что меньше диаметра ядерных пор высших организмов (около 120 нм), а центральный компартмент поры дрожжей имеет более простое строение по сравнению с порами высших эукариот (Yang et al., 1998). В то же время сходство принципов общей организации ЯПК, а именно наличие трех компартментов и асимметричность строения периферических отделов поры у низших и высших эукариот, предполагает, что именно такое строение необходимо для обеспечения возможности двунаправленного транспорта молекул через ЯПК.

Биохимический состав ядерных пор

Ядерные поры низших эукариот. Благодаря биохимическим исследованиям к настоящему времени идентифицированы 32 нуклеопорина дрожжей, среди которых белок Nup60 и 2 интегральных белка POM34p и cdc31 описаны относительно недавно (табл. 1) (Rout et al., 2000). Nup60 является белком basket-структуры ядерной поры, POM34p связан с интегральным белком POM152p, а cdc31p и Ndc1p являются интегральными мембранными белками ЯПК. Следует отметить, что некоторые белки ЯПК являются полифункциональными. Например, нуклеопорины cdc31p и Ndc1p выявляются как в ядерных порах дрожжей, так и в полярных тельцах веретена деления (Chial et al., 1998; Rout et al., 2000). Белок sec13p, являющийся компонентом субкомплекса, необ-

Таблица 1

Нуклеопорины ядерной поры низших (дрожжи) эукариот (Vasu, Forbes, 2001)

Нуклеопорин	Локализация в компартменте ЯПК	Наличие повторов и их тип
Nup1p	Внутриядерный	FG
Nup2p	»	FG
Nup60p	»	FG
N-Nup145p	»	GLFG
Nsp1p	Внутриядерный и цитоплазматический	FG
Gle2p	То же	Не обнаружено
Sec13p	» »	» »
Seh13p	» »	» »
Nup49p	» »	» »
Nup53p	» »	» »
Nup84p	» »	GLFG
Nup85p	» »	Не обнаружено
Nic96p	» »	» »
Nup120p	» »	» »
Nup133p	» »	» »
C-Nup145p	» »	FG
Nup157p	» »	Не обнаружено
Nup188p	» »	» »
Nup192p	» »	FG
Ndc1p	Ядерная мембрана	Не обнаружено
Cdc31p	» »	» »
Pom34p	» »	» »
Pom152p	» »	» »
Nup57p	Центральный	» »
Nup59p	»	» »
Nup170p	»	» »
Gle1p	Цитоплазматический	» »
Nup42p	»	FG
Nup82p	»	Не обнаружено
Nup100p	»	GLFG
Nup116p	»	GLFG
Nup159p	»	FG

Таблица 2

**Нуклеопорины ядерной поры высших эукариот
(Vasu, Forbes, 2001; Cronshaw et al., 2002)**

Нуклеопорин	Локализация в компартменте ЯПК	Наличие повторов и их тип
Seh1 ^a	Внутриядерный?	WD
Gle2(Rae1)	Внутриядерный	Не обнаружено
Sec13	»	» »
Nup50	»	FG
Nup93	»	Не обнаружено
Nup96	»	» »
Nup98	»	GLFG
Nup107	»	Не обнаружено
Nup133	»	» »
Nup153	»	FG
Nup160	»	Не обнаружено
Nup188	»	» »
Nup205	»	» »
Nup155	Внутриядерный и цитоплазматический	» »
Pom 121	Ядерная мембрана	FG
Grp210	» »	Не обнаружено
Nup45	Центральный	FG
Nup54	»	FG
Nup58	»	FG
Nup62	»	FG
Gle1	Цитоплазматический	Не обнаружено
hCG1	»	FG
RanBP1	»	Не обнаружено
Nup88(84)	»	» »
Nup214(CAN)	»	FG
Nup358(RanBP2)	»	FG
ALADIN ^a	Не установлено	WD
Nup35 ^a	» »	Не обнаружено
Nup37 ^a	» »	WD
Nup43 ^a	» »	WD
Nup75 ^a	» »	Не обнаружено

ходимого для экспорта РНК, участвует также в регуляции внутриклеточной секреции (Siniosoglou et al., 1996, 2000). Каждый нуклеопорин дрожжей представлен 8—56 копиями на одну пору (Rout et al., 2000), что хорошо совпадает с молекулярной массой ЯПК (60 МДа), предсказанной на основании изучения изолированных пор (Yang et al., 1998).

30 % белков ЯПК содержат повторы FG (фенилаланин-глицин), или FXFG (фенилаланин-Х-фенилаланин-глицин), или GLFG (глицин-лейцин-фенилаланин-глицин), которые объединены в одно семейство FG-повторов, взаимодействующих со специфическими транспортными факторами (Ryan, Wentе, 2000). Показано, что FG-содержащие домены нуклеопоринов, входящих в состав транспортера, выступают в просвет центрального канала поры и, как предполагают, принимают активное участие в обеспечении транспорта молекул (Ryan, Wentе, 2000). Иммуноэлектронная микроскопия позволила локализовать многие нуклеопорины на отдельных ЯПК,

а биохимический анализ этих белков показал, что они способны формировать комплексы, состоящие из нескольких белков. Неожиданным явился тот факт, что многие нуклеопорины, например, Nsp1p, Nic96p и Nup53p, входят в состав как цитоплазматического, так и внутриядерного отделов ЯПК (Fahrenkrog et al., 1998, 2000; Rout et al., 2000). Только небольшая группа нуклеопоринов имеет специфическую локализацию в ЯПК. Так, например, Nup60p, Nup1p и Nup2 выявляются исключительно на баскет-структуре поры, а белок Nup145Np, содержащий GLFG-повтор, локализуется с ядерной стороны, ближе к центральному каналу поры (Hood et al., 2000; Solsbacher et al., 2000). Если у дрожжей многие нуклеопорины присутствуют как на внутриядерной, так и на цитоплазматической стороне поры, то большинство нуклеопоринов в ЯПК высших эукариот имеют более специфическую локализацию на отдельных компонентах ЯПК (Vasu, Forbes, 2001).

Ядерные поры высших эукариот. С помощью молекулярно-биологических, биохимических, цитологических и иммуногистохимических методов в ядерных порах у позвоночных обнаружены 31 нуклеопорин (табл. 2) и 18 белков, относящихся к классу ЯПК-ассоциированных белков (Vasu, Forbes, 2001; Cronshaw et al., 2002). Показано, что нуклеопорины высших организмов могут формировать 12 субкомплексов, на которые пора разбирается в профазе митоза и из которых она собирается в телофазе (Matsuoka et al., 1999; Smythe et al., 2000). Предполагают, что новые поры могут собираться также из этих субкомплексов во время S-фазы, когда количество пор у позвоночных удваивается (Vasu, Forbes, 2001).

В экспериментах с использованием GFP-(green fluorescent protein)-меченных белков и иммуноэлектронной микроскопии было установлено, что внутриядерный компартмент ЯПК содержит Nup153, Nup98/Gle2, Nup50 и новый субкомплекс Nup107-160, куда входят Nup160/Nup133/Nup96/Nup107 и, возможно, гомолог дрожжевого белка seh1 (рис. 2) (Vasu, Forbes, 2001; Cronshaw et al., 2002). Существует предположение о том, что субкомплекс Nup107-160, взаимодействуя с хроматином, играет определенную роль в образовании ЯПК в составе ядерной оболочки. К компонентам центрального отдела ЯПК относят комплексы Nup62/Nup58/Nup54/Nup45, Nup93, Nup205-Nup188 и белок Nup155 (Vasu, Forbes, 2001). Цитоплазматический отдел поры содержит Nup214, Nup88(84), Nup358 и RanBP1 (Ryan, Wentе, 2000). С нуклеопорином Nup358 связывается убиквитин-подобный модификатор SUMO-1, который также образует связь с RanGAP (белок, активирующий ГТФазу Ran) (Melchior, 2000).

Интегральные мембранные белки grp210 и Pom121 выполняют функцию закрепления ЯПК в мембране. Белок grp210 содержит большой домен, обращенный в перинуклеарное пространство, и короткий, точная локализация которого пока не установлена. Нуклеопорин Pom121 содержит FG-повторы в большом цитоплазматическом домене, а короткий домен этого белка обращен в просвет между мембранами ядерной оболочки (Stoffler et al., 1999; Ryan, Wentе, 2000). Так же как и у низших эукариот, каждый нуклеопорин высших организмов может быть представлен в количестве от 8 до 56 копий, что дает в сумме около 1000 белков на одну пору (Vasu, Forbes, 2001).

Большое внимание уделяется изучению белка Nup153, входящего в состав внутриядерного и, возможно, терми-

нального кольца basket-структуры; Nup153, как предполагают, участвует в инициации сборки ядерной оболочки, предшествующей формированию ЯПК в митозе (Smythe et al., 2000). Установлено, что Nup153 необходим как для импорта, так и для экспорта молекул (Bastor et al., 1996; Ullman et al., 1999), он выявляется в разных участках ЯПК и, возможно, является «шатлинг»-белком, перемещающимся вдоль всей поры (Nakielny et al., 1999).

Белок Nup98 также входит в состав basket-структуры поры и вовлечен в экспорт РНК (Powers et al., 1997; Ryan, Wente, 2000). N-концевой домен этого белка содержит GLFG-повтор, связывающий транспортные факторы Rael/Gle2, TAP и Crm1, в то время как C-концевой домен связывается с комплексом Nup160 (Vasu, Forbes, 2001). Предполагается, что Nup98 и тесно взаимодействующий с ним Nup96, выявляемые в basket-структуре ЯПК, могут являться производными Nup145р дрожжей, который в ходе эволюции разделился на два белка (Teixeira et al., 1999). Интересно, что GLFG-повтор Nup98 служит мишенью для вируса стоматита (VSV) (Petersen et al., 2000). Предполагают, что белок матрикса VSV может связываться с Nup98 и нарушать экспорт мРНК и импорт ядерных белков хозяина (Von Kobbe et al., 2000).

Относительно недавно были открыты два новых нуклеопорина позвоночных — Nup50 (Guan et al., 2000; Smitherman et al., 2000) и Nup188 (Matsuoka et al., 1999; Stoffer et al., 1999). Nup50 локализован в basket-структуре ядерной поры и содержит FG-повтор. Этот белок принимает участие в экспорте, осуществляемом транспортным фактором Crm1, который связывается с молекулами, содержащими NES-(nuclear export sequense)-последовательность, но не принимает участия в импорте белков. Биохимические исследования подтвердили, что Nup50 содержит рецептор раннего связывания с NES-комплексом и взаимодействует с расположенными рядом с ним Nup153 и ингибитором клеточного цикла p27. Следует добавить, что иммунофлуоресцентный анализ белков Nup50, Nup96, Nup98 и Nup153 выявил также их локализацию внутри ядра, однако до сих пор остается неясным, выполняют ли эти белки какую-либо дополнительную роль непосредственно в ядре (Vasu, Forbes, 2001).

Исследования последних лет выявили еще 6 нуклеопоринов, получивших названия Nup35, Seh1, Nup75, Nup37, Nup43 и ALADIN, взаимодействующих с антителами mAb414, которые окрашивают и другие белки ЯПК (Cronshaw et al., 2002). Эти 6 белков достаточно хорошо охарактеризованы, но пока не установлено, в каком компартменте ЯПК они локализованы. Анализ их аминокислотной последовательности показал, что белки Nup75, Nup35 и Seh1 имеют гомологию с некоторыми известными нуклеопоринами. Так, Nup75 имеет 19 % гомологии с Nup85 дрожжей, Nup35 на 21 % идентичен Nup53р дрожжей, а Seh1 имеет высокую гомологию с дрожжевым нуклеопорином Seh1p (30 %) и с нуклеопорином позвоночных Sec13R (34 %) (Cronshaw et al., 2002).

В составе Seh1-белка обнаружено 6 WD-повторов (WD — дипептиды триптофана и аспартата), он является одним из кандидатов в гомологи человеческого нуклеопорину Sec1p как по последовательности аминокислот (50 % идентичности), так и функционально (Cronshaw et al., 2002). Биохимический анализ также показал, что кроме Seh1 еще 3 нуклеопорина — Nup37, Nup43 и ALADIN — содержат WD-повторы, которые встречаются в различных эукариотических белках, составляющих осо-

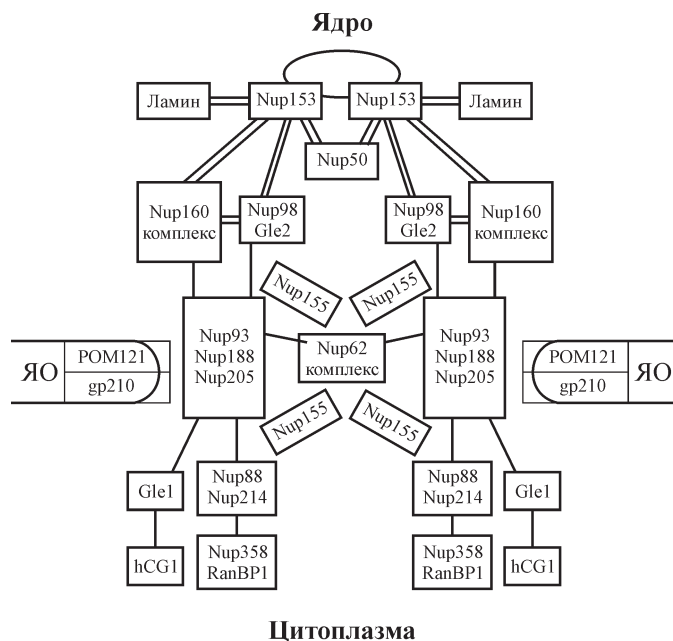


Рис. 2. Белковый состав различных компартментов ядерного порового комплекса (модифицирована из: Vasu, Forbes, 2001).

ЯО — ядерная оболочка.

бое субсемейство. Белки этого субсемейства имеют сходную поверхность и, возможно, общих партнеров для связывания (Smith et al., 1999). Это послужило основанием для предположения о возможном участии нуклеопоринов, содержащих WD-повторы, в сборке крупных мультисубъединичных комплексов ЯПК, которые выявляются в митозе (Cronshaw et al., 2002). Поскольку Nup37, Nup43 и ALADIN не имеют гомологов среди дрожжевых нуклеопоринов, предполагается, что они выполняют специфическую функцию в ЯПК у высших эукариот (Cronshaw et al., 2002). В последнее время с использованием FRAP-метода (Fluorescence Recover After Photobleaching) было показано, что нуклеопорины высших эукариот по длительности их взаимодействия с ЯПК можно разделить на три группы: 1) стабильные, которые обновляются за 35 ч и более, составляя каркас ЯПК; 2) те, которые обновляются за 2.5—30.0 ч и, вероятно, активно участвуют в транспорте молекул; 3) белки, обновляющиеся в течение нескольких секунд или минут, основная функция которых не связана с ЯПК (Rabut et al., 2004).

Механизмы транспорта молекул через ядерную пору

Известно, что каждую секунду ЯПК может обеспечивать транспорт до 400 молекул и более (Masara, 2001). Ионы и молекулы меньше 9 нм в диаметре могут свободно (пассивно) диффундировать через периферические каналы и центральный канал поры, который в неактивном состоянии имеет диаметр около 10 нм. Более крупные образования, такие, например, как рибосомные субъединицы, имеющие диаметр около 20 нм, белки и РНП-частицы, транспортируются через ЯПК активно, т. е. с затратой энергии. Энергетически-зависимый транспорт обеспечивается малой ГТФ-азой Ran, существующей в ГТФ- и ГДФ-связанной формам. Ran-ГТФ обнару-

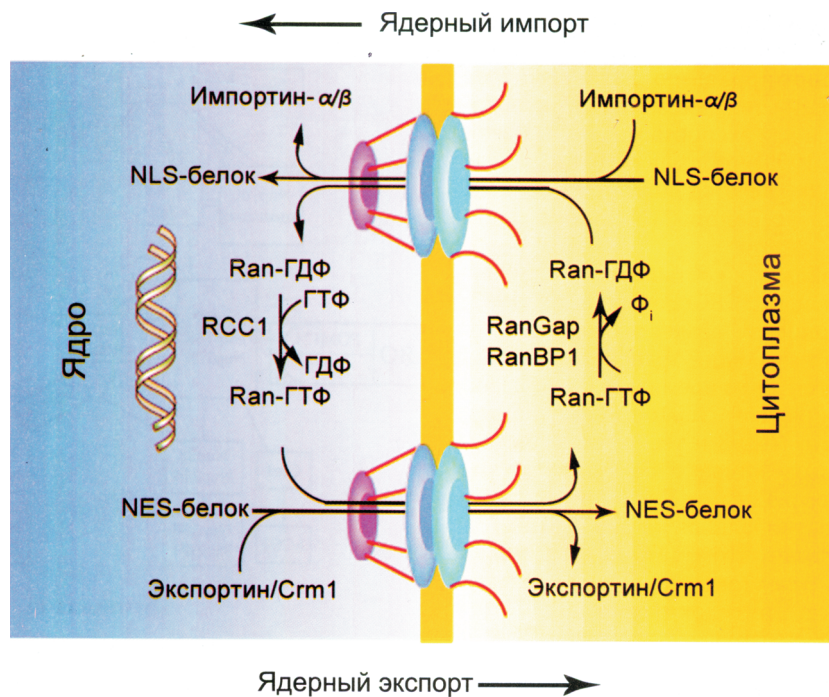


Рис. 3. Схема, демонстрирующая функциональную роль Ran-белка в регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта (модифицирована из: Clarke, Zhang, 2001).

Ran-белок постоянно курсирует через ядерные поровые комплексы, но накапливается преимущественно в ядре за счет его активного импорта. Высокая концентрация Ran-ГТФ в нуклеоплазме создается за счет каталитической активности белка RCC1, связанного с хроматином. Ran-ГТФ вызывает диссоциацию импортируемого комплекса, содержащего белок с последовательностью NLS (nuclear localization sequence), за счет его связывания с импортином β . Связывание Ran-ГТФ с экспортином/Crm1 в ядре способствует сборке экспортируемого комплекса, содержащего белок с последовательностью NES (nuclear export sequence). В цитоплазме Ran-ГТФ переходит в Ran-ГДФ и фосфатную группу (Φ) под действием Ran-ГТФазы, которая активируется RanGAP и RanBP1, в результате чего экспортируемый комплекс освобождается.

живается преимущественно в ядре и образуется из Ran-ГДФ при участии митотического фактора RCC1 (regulator of chromosome condensation), связанного с хроматином (Bischoff, Ponstingl, 1991). Ran-ГДФ присутствует в основном в цитоплазме и формируется при гидролизе ГТФ с участием специфического для Ran-ГТФазы активирующего белка RanGAP1 (GTPase-activating protein) и его активатора RanBP1 (Ran-binding proteins) (рис. 3) (Bischoff et al., 1994).

Показано, что единственный импорт молекул через ЯПК в условиях *in vitro* не требует затраты энергии, тогда как при множественном импорте и экспорте необходимо потребление энергии, обеспечиваемой гидролизом Ran-ГТФ (Englmeier et al., 1999; Ribbeck et al., 1999). Градиент концентрации Ran-ГТФ/Ran-ГДФ обеспечивает направление ядерно-цитоплазматического транспорта молекул и поддерживается при помощи транспортного фактора NTF2 (nuclear-transport factor 2, p10 или p15) (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). Этот белок специфически связывается с Ran-ГДФ и нуклеопорином Nup62, а затем перемещается через ЯПК в ядро, где RCC1 запускает разборку Ran-ГДФ/NTF2-комплекса и переводит Ran-ГДФ в Ran-ГТФ-форму (Clarkson et al., 1996; Steward et al., 1998). NTF2 за счет своих малых размеров (15 кДа) может быстро диффундировать через ЯПК, способен связываться одновременно с двумя молекулами Ran-ГДФ и переносить их в ядро, оптимизируя скорость транспорта молекул (Steward et al., 1998).

Импорт молекул. Благодаря молекулярно-биологическим и биохимическим исследованиям механизма транспорта молекул через ЯПК к настоящему времени

показано, что специфические белки — импортин и экспортин — связываются с сигнальной последовательностью транспортируемой молекулы и осуществляют ее импорт или экспорт из ядра (рис. 3). Ключевой характеристикой всех белков — переносчиков импортируемых молекул — является их способность формировать комплекс с Ran-ГТФ/ГДФ и транспортируемой молекулой (Masara, 2001). Согласно классической схеме импорта, белки, содержащие NLS-последовательность (nuclear localization sequence), являются субстратом, с которым связывается импортин α (согласно другой номенклатуре, кариоферин α) (Moroianu et al., 1995). Затем импортин β (p 97 или кариоферин β) связывается с N-концевым доменом импортина α и обеспечивает прикрепление сформировавшегося комплекса NLS-субстрат—импортин α/β к цитоплазматическому компартменту ЯПК. Далее этот комплекс транспортируется вместе с Ran-ГДФ через ЯПК в ядро, где распадается на составные компоненты. В освобождении импортируемой молекулы принимает участие Ran-ГТФ, который связывается с импортин β и заканчивает тем самым процесс импорта (Clarke, Zhang, 2001).

Показано, что импортин β без участия импортина α может формировать комплексы непосредственно с транспортируемым белком (Palmeri et al., 1999), а также с белком снурпортин (snurportin), связывающимся со сплайсосомной РНК (Görllich et al., 1994), белком XRIP α , взаимодействующим с ДНК-хеликазами (Jullien et al., 1999), и с импортин γ , который обеспечивает импорт гистона H1 (Taura et al., 1998; Jakel et al., 1999). Установлено также, что импортин β обеспечивает импорт регу-

ляторных белков вируса иммунодефицита человека Tat и Rev (Truant et al., 1999). Это обусловлено наличием у этих белков особой последовательности, гомологичной домену импорта α , связывающемуся с импортином β . Импортин α кодируется с одним геном у дрожжей, но существует в шести изоформах, каждая из которых отличается по последовательности С-концевого домена, что характерно и для млекопитающих. Каждая из этих изоформ опознает различные последовательности импортируемых белков с различным сродством, хотя известно, что все изоформы одинаково связываются с вирусом SV40 (Tsuji et al., 1997; Welch et al., 1999). Известно, что импортин β связывается с нуклеопоринами: Nup358 (RanBP2 — в другой номенклатуре), входящим в состав цитоплазматических фибрилл ЯПК, p62 — компонентом центрального канала ядерных пор, а также Nup153, локализуемым в баскет-структуре ЯПК, и, таким образом, принимает непосредственное участие в транспорте (Allen et al., 2000; Ryan, Wenter, 2000).

Кроме классической NLS-последовательности в составе гетерогенных РНК-связывающихся белков A1 и A2 (hnRNP A1 и hnRNP A2), которые курсируют между ядром и цитоплазмой, но преимущественно выявляются в ядре, была обнаружена последовательность, названная M9 (Siomi, Dreyfuss, 1995). Данная последовательность обнаружена в С-концевом домене РНК-связывающихся белков и состоит из 38 аминокислот (Michael et al., 1995). M9 значительно отличается от классической NLS-последовательности по аминокислотному составу, но является необходимой и достаточной для импорта в ядро данного семейства белков (Siomi, Dreyfuss, 1995). Удивительным оказался тот факт, что эта же последовательность служит и для экспорта hnRNP A1-белка в цитоплазму (Michael et al., 1995), что, как было показано, возможно только при наличии его связи с мРНК (Weighardt et al., 1995).

Единственным известным к настоящему времени транспортным фактором, способным связываться с последовательностью M9, является транспортин 1 (белок с мол. массой 101 кДа, идентичный на 24 % импортину β), который переносит белки, содержащие M9, в ядро, не вовлекая дополнительных факторов (Cordes et al., 1997). Взаимодействуя с RanГТФ внутри ядра, транспортин 1 меняет свою конформацию, в результате чего происходит освобождение транспортируемой молекулы. Затем комплекс транспортин 1/Ran-ГТФ перемещается в цитоплазму, где в результате гидролиза ГТФ он диссоциирует на отдельные компоненты. Взаимодействует ли транспортин 1 с теми же белками ядерной поры, что и импортин β , или с другими нуклеопоринами, остается пока неизвестным (Cordes et al., 1997).

Экспорт молекул. Для экспорта молекул требуется Ran-ГТФ, который обеспечивает сборку экспортного комплекса в ядре, а также способствует его диссоциации в цитоплазме за счет гидролиза Ran-ГДФ (Masara, 2001). Наиболее хорошо изученными регуляторами экспорта молекул являются экспортин Crm1 (exportin или Xpo 1), обеспечивающий экспорт белков, Tap-1/Mex67, необходимый для экспорта мРНК, и калрекуллин (calreticulin), способствующий экспорту стероидных рецепторов из ядра (Masara, 2001). Все эти регуляторы опознают короткие лейцин-богатые NES-районы транспортируемых молекул и связываются с ними. Следует отметить, что белки, несущие NES-последовательности, в свою очередь способны взаимодействовать с различными видами РНК (Masara, 2001). Комплекс

NES-субстрат/Crm1/Ran-ГТФ экспортируется с ядерной на цитоплазматическую сторону ЯПК, где нуклеопорин RanBP1 обеспечивает связывание комплекса с ядерной порой (Kehlenbach et al., 1999). RanGAP, также локализуемый на цитоплазматической стороне поры (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997), активирован ГТФазной активностью Ran, используя RanBP1 как кофактор, в результате чего Ran-ГТФ переходит в Ran-ГДФ (Bischoff et al., 1995). Так как Ran-ГДФ имеет низкое сродство к Crm1, он быстро диссоциирует из комплекса, что вызывает освобождение NES-белка от Crm1, после чего освобожденный Crm1 возвращается в ядро (рис. 3). Изучение ядерно-цитоплазматического транспорта выявило еще один кофактор, участвующий в Crm1-опосредованном транспорте. Это белок Nxt1 (p15) (на рис. 3 не показан), который связывается непосредственно с Crm1 и вместе с RanBP3 стабилизирует транспортируемый комплекс, а также способствует заключительным этапам Crm1-зависимого экспорта (Black et al., 2001; Hofmann et al., 2001).

Другой белок, участвующий в экспорте, — экспортин T (Los1) — является единственным из известных на сегодня транспортных факторов, способных связываться с РНК без посредников (Arts et al., 1998). Этот белок отвечает за транспорт тРНК. Он может опознавать только созревшую тРНК и тем самым осуществлять контроль за процессами ее модификации и сплайсинга (Kutay et al., 1998; Lund, Dahlberg, 1998).

Экспортный фактор Tap-1 (NXF1, согласно другой номенклатуре), гомологичный Mex67, — фактор, экспортирующий мРНК у дрожжей, обеспечивает транспорт РНК ретровирусов, хотя существует предположение о том, что этот фактор может обеспечивать экспорт эндогенной мРНК у млекопитающих (Gruter et al., 1998; Katahira et al., 1999). Установлено, что у дрожжей в экспорте мРНК кроме Mex67 участвуют другие факторы, такие как Np13, Nab2, Hrp1 и Dbp5 (Cole, 2000). Белки Np13, Nab2 и Hrp1 связываются с мРНК в ядре и с нуклеопоринами Gle1 и Gle2, а белок Dbp5 участвует в декомпактизации РНК на цитоплазматической стороне ядерной поры (Masara, 2001).

Исследования экспорта 50-нанометровой РНП-частицы — продукта генов колец Бальбиани в слюнных железах хирономуса, выполненные с помощью сканирующего электронного микроскопа, позволили выявить последовательные этапы реорганизации ЯПК в течение этого процесса (Kiseleva et al., 1996, 1998). Было показано, что в неактивном состоянии оба входа в центральный канал поры закрыты периферическими гранулами транспортера, а со стороны ядра — дополнительно фибриллами баскет-структуры. На первом этапе экспорта РНП-частица прикрепляется к верхушке баскет-структуры, фибриллы которой формируют увеличивающееся в размере терминальное кольцо. Предполагается, что Nup153 и Nup98 принимают активное участие в этом событии (Allen et al., 2000; Ryan, Wente, 2000). Частица постепенно продвигается внутрь баскета, где она декомпактизуется в 26-нанометровую фибриллу и поворачивается, ориентируясь так, чтобы первым в центральный канал поры проник 5'-конец (Kiseleva et al., 1996; Daneholt, 1997). На следующем этапе в периферической грануле транспортера со стороны ядра открывается отверстие и РНП-фибрилла начинает перемещаться внутрь поры (Kiseleva et al., 1996, 1998). Внутренний диаметр канала транспортера, имевший до этого размер 10 нм, расширяется до

26 нм, и фибрилла перемещается в сторону цитоплазмы. В периферической грануле ЯПК со стороны цитоплазмы также формируется отверстие диаметром 26 нм, и РНП-фибрилла полностью выходит в цитоплазму, где начинается процесс трансляции. После окончания транспорта все компоненты ЯПК возвращаются в исходное состояние. Было установлено, что в процессе транспорта периферические гранулы транспортера могут смещаться в вертикальном направлении на 5 нм, а сама пора — уплощаться или вытягиваться, что, возможно, способствует более эффективному движению транспортируемой молекулы. Поскольку ЯПК с одной стороны тесно связан с ламиной (Goldberg et al., 1998) и, возможно, с ядерным матриксом (Kiseleva et al., 2004), а с другой, через ядерную оболочку, — с цитоскелетом, можно предположить, что в регуляции процесса ядерно-цитоплазматического транспорта молекул эти внутриклеточные компоненты также принимают активное участие.

Модели транспорта молекул. В настоящее время предложены три модели транспорта через ЯПК. Согласно первой модели, транспорт молекул по центральному каналу ЯПК обусловлен присутствием в нуклеопоринах FG-повторов, которые имеют сродство к факторам, участвующим в регуляции транспорта (Ribbeck, Görlich, 2002; Strawn et al., 2004). Исследование структуры импортина β , TAP и NTF2 показали, что все три молекулы содержат кластеры гидрофобных аминокислот, которые способны взаимодействовать с FG-повторами нуклеопоринов. Согласно предложенной модели, FG-повторы нуклеопоринов центрального канала формируют своеобразное гидрофобное сито, которое дает возможность пассивно диффундировать только мелким молекулам. При транспортировке крупных молекул гидрофобные участки транспортных факторов взаимодействуют с гидрофобным ситом и локально растворяют преграду, что позволяет им продвигаться по центральному каналу. После прохождения транспортного фактора в комплексе с переносимой молекулой гидрофобная сеть восстанавливается.

Вторая модель переноса молекул через ядерную пору основана на существовании различного сродства транспортных рецепторов к FG-повторам нуклеопоринов. Было обнаружено, что в процессе экспорта из ядра по направлению к дистально расположенным нуклеопоринам сродство FG-повторов к транспортному фактору возрастает в 20 раз, так что транспортируемая молекула может передаваться от одного нуклеопорина к другому, как эстафетная палочка (Ben-Efraim, Gerace, 2001). Однако эта модель в настоящее время подвергается критике, так как она не обеспечивает выявленной высокой скорости транспорта молекул (более 300 молекул в 1 с) через ЯПК в обоих направлениях (Ribbeck, Görlich, 2001; Siebrasse, Peters, 2002).

Раут с коллегами (Rout et al., 2000) предложили третью модель, согласно которой молекулы диффундируют через центральный канал ЯПК, а направление их транспорта определяется локализацией связывающихся с ними транспортных факторов, имеющих сродство к нуклеопоринам цитоплазматического или внутриядерного отдела поры. Действительно, электронно-микроскопические исследования показали, что транспортные факторы могут накапливаться на цитоплазматических филаментах, и это, как предполагалось, предшествует импорту (Paschal, 2002). Однако более поздние исследования показали, что участие цитоплазматических филаментов не является

обязательным фактором для обеспечения транспорта молекул (Walther et al., 2002), и это делает третью модель сомнительной. Кроме того, эта модель не объясняет, почему при транспорте через пору крупных РНП-частиц регистрируются структурные изменения в центральном канале поры.

Особенности сборки ядерных пор *in vitro* и *in vivo*

Процесс деления ядер в клетках высших эукариот происходит по типу открытого митоза. На стадии профазы митоза хромосомы конденсируются и ядерная оболочка вместе с ламиной полностью или частично (для дрозофилы) разбирается, а на стадии телофазы все собирается вновь. Сборка и разборка ядерных пор интенсивно изучались и изучаются в экспериментах *in vitro*, благодаря которым была получена уникальная информация о последовательных этапах и механизмах регуляции этих процессов. При этом в большинстве случаев используется цитоплазматический экстракт из ооцитов амфибий, который инкубируется с компактным хроматином спермы, и за 1.5—2.5 ч такой инкубации формируются функционально активные (способные к репликации и транскрипции) ядра со зрелыми ядерными порами (Marshall et al., 1997; Lohka, 1998). На первом этапе сборки гладкие и шероховатые пузырьки эндоплазматического ретикулума, различающиеся по составу белков, связываются с поверхностью деконденсирующегося хроматина, а затем сливаются вместе, формируя внутреннюю и наружную ядерные мембраны (Marshall, 1997). Установлено, что для осуществления этого процесса необходимы ионы Ca^{2+} (Peters, Mayer, 1998) и Ran-ГТФ (Clarke, Zhang, 2001). Показано также, что импортин β может инициировать слияние пузырьков и сборку ЯПК (Harel et al., 2003).

Исследования формирующейся *in vitro* ядерной оболочки с использованием высококоразрешающей сканирующей электронной микроскопии позволили получить новые данные о последовательности событий, происходящих в области цитоплазматического компартмента ядерной поры (Goldberg et al., 1997; Marshall, 1997). Было показано, что после формирования вокруг декомпактизуемого хроматина крупных фрагментов ядерной оболочки в них начинается сборка ЯПК. Сначала в различных участках наружной ядерной мембраны появляются небольшие углубления, которые затем превращаются в небольшие поры размером 10—20 нм. Далее диаметр пор увеличивается до 40 нм и начинается последовательное формирование сначала центральных, а затем периферических компонентов ЯПК. Установлено, что сборка составляющих пору отдельных компонентов происходит асинхронно: сначала образуется одна составляющая компонент субъединица, затем вторая и т. д. При этом пора постепенно увеличивается в размере и за 4—6 мин превращается в зрелую пору диаметром 110—120 нм (Goldberg et al., 1997). Эти данные впервые продемонстрировали, что сборка ЯПК осуществляется за счет формирования промежуточных структур. Следует отметить, что процесс сборки ядерных пор со стороны ядра до сих пор до конца не изучен, также неясен и вопрос о синхронности формирования периферических отделов ядерных пор. С использованием митотического

экстракта в опытах *in vitro* было показано, что распад ядерной оболочки происходит за счет формирования длинных трубочек и цистерн, напоминающих компоненты эндоплазматического ретикула (Cotter et al., 1998).

Результаты экспериментов по исследованию механизмов распада и сборки ядерных пор *in vitro* были подтверждены нами в опытах *in vivo* при изучении деления ядер в ранних эмбрионах дрозофилы (Kiseleva et al., 2001). Было продемонстрировано, что при разборке ЯПК, которая начинается в профазе митоза, сначала разбираются центральные, затем периферические компоненты пор, после чего распадается ядерная оболочка. Сборка новых пор начинается на стадии ранней телофазы, после формирования ядерной оболочки, и проходит через те же промежуточные структуры (рис. 4), которые наблюдались при формировании ЯПК в опытах *in vitro*. Интересно, что формирование пор в экспериментах *in vivo* инициируется преимущественно в участках слияния мембран пузырьков эндоплазматического ретикула с наружной ядерной мембраной. При этом сначала встраивается центральный транспортер, затем собираются звездчатое и тонкое кольца и в последнюю очередь формируются цитоплазматические гранулы и фибриллы (Kiseleva et al., 2001). Таким образом, этот процесс является зеркальным отражением разборки ЯПК в профазе. Можно предположить, что сборка ЯПК со стороны нуклеоплазмы должна происходить аналогично тому, что наблюдается со стороны цитоплазмы, за исключением того, что вместо гранул с фибриллами будет формироваться баскет-структура.

Существуют неоднозначные данные относительно последовательности сборки нуклеопоринов в ЯПК в ранней анафазе. Эксперименты *in vivo* показали, что в поздней анафазе с хроматином связываются нуклеопорин Nup153 и белок ядерной ламина LAP2 (Vodoog et al., 1999a, 1999b). После образования двух мембран ядерной оболочки вокруг декомпактизирующихся хромосом инициируется формирование ЯПК и встраивание в них белка Pom121 и субкомплекса p62, включающего в себя также белки p58, p54 и p45. Затем в ядерную пору встраиваются нуклеопорин CAN/Nup214, который образует комплекс с белком Nup88(84), и белок gp210, который ассоциируется с мембранами ядерной оболочки в поздней телофазе. Эти данные согласуются с более поздними экспериментами, в которых проводилось прижизненное исследование культуры клеток, где было показано, что Pom121 впервые наблюдается вокруг компактных хромосом в поздней анафазе (Imreh, 2000). По данным других авторов (Smythe et al., 2000), эксперименты по сборке ЯПК из экстрактов яиц *Xenopus* показали, что сначала собирается комплекс, состоящий из нуклеопоринов Nup62 и Nup214, а затем к нему присоединяется Nup153. Существует также предположение о том, что сборка ЯПК у позвоночных инициируется путем захвата хроматином комплекса Nup107-Nup160 (Walther et al., 2003; Harel et al., 2003b). До сих пор неясно, какова последовательность сборки белков на самых начальных этапах формирования ЯПК *de novo* и что инициирует слияние мембран в этом участке. Предполагается, что Pom121 необходим на первом этапе слияния двух мембран ядерной оболочки (Vodoog et al., 1999), тогда как gp210, в большом количестве накапливающийся вблизи поры, обеспечивает ее стабильность и встраивание в этот участок других нуклеопоринов (Vasu, Forbes, 2001). Вопрос о

сборке—разборке ЯПК у низших эукариот, у которых деление ядер происходит по типу закрытого митоза, пока досконально не изучен. Согласно имеющимся данным, ЯПК дрожжей разбирается и собирается асинхронно, возможно через промежуточные компоненты, аналогичные тем, что описаны для высших эукариот (Winey et al., 1997; Kiseleva et al., 2004).

Наши последние исследования (Onischenko et al., 2005) показали, что ведущая регуляторная роль в разборке и сборке поровых комплексов принадлежит циклинзависимой киназе 1 (cdk1) и циклину В (cyclin B). Увеличение концентрации циклина В до порогового значения активирует циклинзависимую киназу cdk1, которая в профазе фосфорилирует нуклеопорины и инициирует распад ядерных пор. Сборка ядерной оболочки и ЯПК начинается в телофазе, когда, как было показано для эмбрионов дрозофилы, под действием фосфатаз PP1 и PP2A происходит дефосфорилирование нуклеопоринов.

Заключение

Подводя итог, следует подчеркнуть, что именно комплексное использование цитологических, биохимических и молекулярно-биологических методов обеспечило быстрый прогресс в изучении тонких деталей структурной организации и белкового состава ядерных пор. К настоящему времени продемонстрирована консервативность строения ЯПК в эволюции и показано, что каждая пора состоит из трех связанных между собой компарментов и большого количества индивидуальных компонентов. Показано, что белков поры около 30 и они могут формировать сложные комплексы, участвующие в организации индивидуальных компонентов пор. Исследованы механизмы импорта и экспорта молекул через ядерные поры и предложено несколько моделей этого процесса. Комплексный подход в изучении сборки и разборки ЯПК в условиях *in vivo* и *in vitro* позволил выяснить последовательность распада и сборки их индивидуальных компонентов на разных стадиях митоза, а также определить временную динамику встраивания нуклеопоринов в формирующуюся пору.

В то же время многие вопросы, связанные со структурой, динамикой и функцией ЯПК, все еще не до конца исследованы. Так, например, до сих пор четко не установлено, какие нуклеопорины входят в состав филаментов баскет-структуры ЯПК, как располагаются различные домены каждого нуклеопорина внутри поры, какова структура центрального канала ЯПК, какую роль в транспорте молекул выполняют различные повторы, присутствующие в нуклеопоринах, каким образом интегральные белки ЯПК распределяются среди компарментов ЯПК при разборке ядерных пор, как происходит сборка ЯПК в интерфазе и в растущих неделящихся ядрах, каким образом элементы цитоскелета и ядерного матрикса вовлечены в регуляцию транспорта через ядерную пору и т. д. Детальное исследование этих вопросов обеспечит получение новых данных, которые позволят лучше понять как структурную и функциональную динамику ЯПК в разных клетках, так и регуляторные механизмы ядерно-цитоплазматического транспорта.

Авторы выражают благодарность И. К. Захарову за критическую оценку рукописи и ценные замечания.

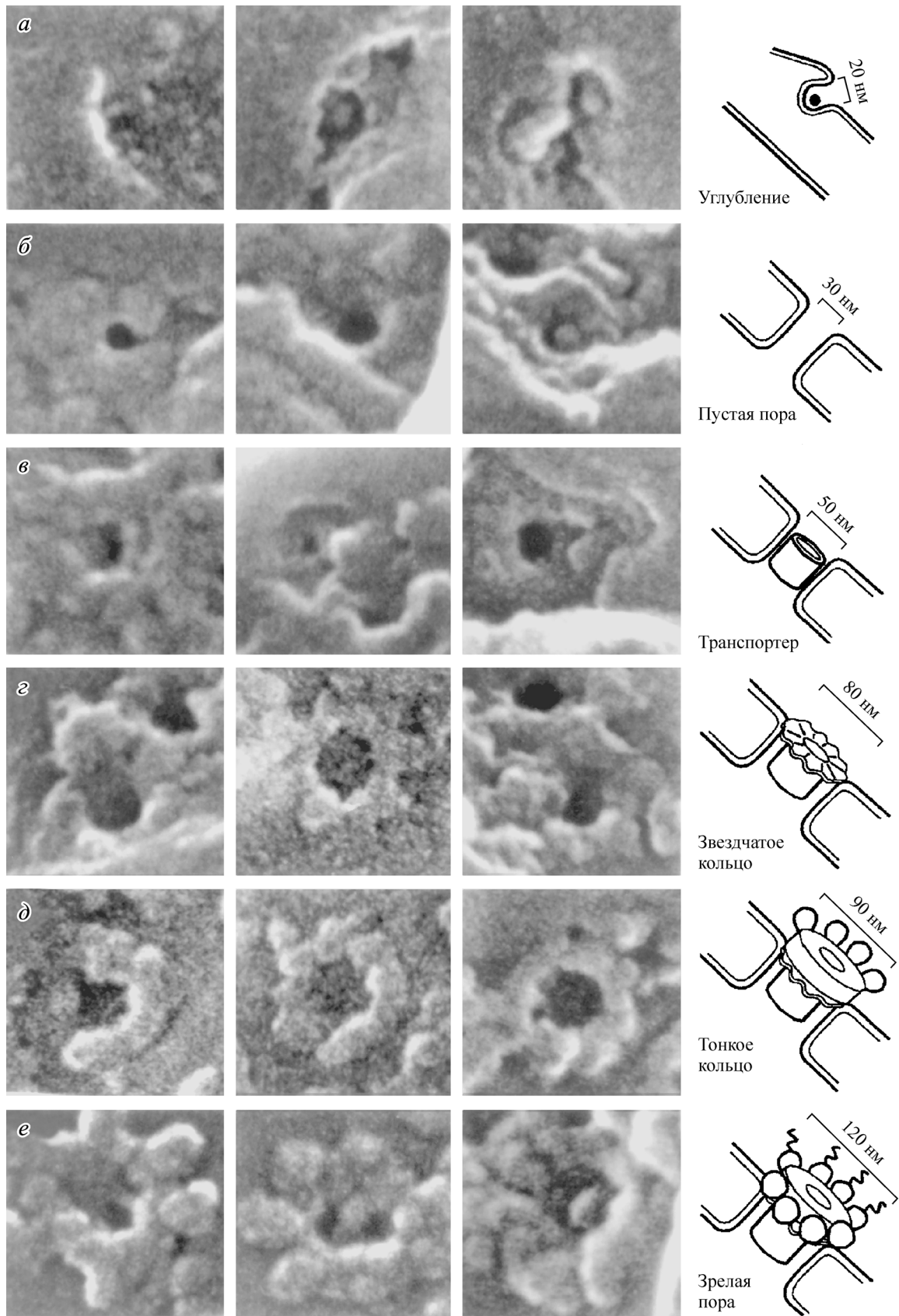


Рис. 4. Фотографии промежуточных структур цитоплазматического компартмента, формирующихся при сборке ядерных пор в ранних эмбрионах дрозофилы (a—e), и схема последовательных этапов этого процесса (Kiseleva et al., 2001).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-48261-а), фонда Wellcome Trust (Англия), а также гранта для молодых ученых им. акад. Лаврентьева СО РАН (проект 106).

Список литературы

- Akey C. W. 1989. Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 109 : 955—970.
- Akey C. W., Radermacher M. 1993. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* 122 : 1—19.
- Allen T. D., Cronshaw Bagley S., Kiseleva E., Goldberg M. W. 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.* 113 : 1651—1659.
- Arts G. J., Fornerod M., Mattaj J. W. 1998. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* 8 : 305—314.
- Bastor R., Lin A., Enarson M., Burke B. 1996. Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153. *J. Cell Biol.* 134 : 1141—1156.
- Belgareh N., Doye V. 1993. Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant yeast cells. *J. Cell Biol.* 136 : 747—759.
- Ben-Efraim I., Gerace L. 2001. Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J. Cell Biol.* 152 : 411—417.
- Bischoff F. R., Klebe C., Kretschmer J., Wittinghofer A., Postingl H. 1994. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear ras-related Ran. *Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 2587—2591.
- Bischoff F. R., Postingl H. 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature.* 354 : 80—82.
- Black B. E., Holaska J. M., Levesque L., Ossareh-Nazari B., Gwizdek C., Dargemont C., Paschal B. M. 2001. NXT1 is necessary for the terminal step of Crm1-mediated nuclear export. *J. Cell Biol.* 152 : 141—156.
- Bodoor K., Shaikh S., Enarson P., Chowdhury S., Salina D., Raharjo W. H., Burke B. 1999a. Function and assembly of nuclear pore complex proteins. *Biochem. Cell. Biol.* 77 : 321—329.
- Bodoor K., Shaikh S., Salina D., Raharjo W. H., Bastos R., Lohka M., Burke B. 1999b. Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J. Cell Sci.* 112 : 2253—2264.
- Bucci M., Wente S. R. 1997. *In vivo* dynamics of nuclear pore complexes in yeast. *J. Cell Biol.* 136 : 1185—1199.
- Chial H. J., Rout M. P., Giddings T. H., Winey M. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* Ndc 1p is shared component of nuclear pore complexes and spindle pole bodies. *J. Cell Biol.* 143 : 1789—1800.
- Clarke P. R., Zhang C. 2001. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle. *Trends in Cell Biol.* 11 : 366—371.
- Clarkson W. D., Kent H. M., Stewart M. 1996. Separate binding sites in nuclear transport factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the phenylalanine-rich repeat regions of nucleoporins p62 and Nsp 1p. *J. Mol. Biol.* 263 : 517—524.
- Cole C. N. 2000. mRNA export: the long and winding road. *Nat. Cell Biol.* 2 : E55—E58.
- Cordes V. C., Rackwitz H., Reidenbach S. 1997. Mediators of nuclear protein import target karyophilic proteins to pore complexes of cytoplasmic annulate lamellae. *Exp. Cell Res.* 237 : 419—433.
- Cotter L. A., Goldberg M. W., Allen T. D. 1998. Nuclear pore complex disassembly and nuclear envelope breakdown during mitosis may occur by both nuclear envelope vesicularisation and dispersion throughout the endoplasmic reticulum. *Scanning.* 20 : 250—251.
- Cronshaw J. M., Krutchinsky A. N., Zhang W., Chait B. T., Matunis M. J. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158 : 915—927.
- Daneholt B. 1997. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell.* 88 : 585—588.
- Englmeier L., Olivo J. C., Mattaj J. W. 1999. Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr. Biol.* 9 : 30—41.
- Fahrenkrog B., Hubner W., Mandinova A., Pante N., Kellner W., Aebi U. 2000. The yeast nucleoporin Nup53p specifically interacts with nic96p and directly involved in nuclear protein import. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 3885—3896.
- Fahrenkrog B., Hurt E. C., Aebi U., Pante N. 1998. Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J. Cell Biol.* 143 : 577—588.
- Goldberg M., Lu H., Stuurman N., Ashery-Padan R., Weiss A., Yu J., Bhattacharyya D., Fisher P., Gruenbaum Y., Wolfner M. 1998. Interaction among *Drosophila* nuclear envelope proteins lamins, otefin, and YA. *Mol. Cell. Biol.* 18 : 4315—4323.
- Goldberg M. W., Allen T. D. 1993. The nuclear pore complex: three-dimensional surface structure revealed by field emission, in-lens scanning electron microscopy, with underlying structure uncovered by proteolysis. *J. Cell Sci.* 106 : 261—274.
- Goldberg M. W., Allen T. D. 1996. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 257 : 848—865.
- Goldberg M. W., Wies C., Allen T. D., Wilson K. L. 1997. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates nuclear pore assembly. *J. Cell. Sci.* 110 : 409—420.
- Görlich D., Pante N., Kutay U., Bischoff F. R. 1996. Identification of different roles for RanGdp and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15 : 5584—5594.
- Görlich D., Prehn S., Laskey R. A., Hartmann E. 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell.* 79 : 767—778.
- Gruter P., Tabernero C., von Kobbe C., Schmitt C., Saavedra C., Bachi A., Wilm M., Felber B. K., Izaurralde E. 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell.* 1 : 649—659.
- Guan T., Kehlenbach R. H., Schirmer E. C., Kehlenbach A., Fan F., Clurman B. E., Arnheim N., Gerace L. 2000. Nup50, a nucleoplasmically oriented nucleoporin with a role in nuclear protein export. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 5631—5642.
- Harel A., Chan R. C., Lachish-Zalait A., Zimmerman E., Elbaum M., Forbes D. J. 2003a. Importin β negatively regulates nuclear membrane fusion and nuclear pore complex assembly. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 4387—4396.
- Harel A., Orjalo A. V., Vincent T., Lachish-Zalait A., Vasu S., Shan S., Zimmerman E., Elbaum M., Forbes D. J. 2003b. Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Mol. Cell.* 11 : 853—864.
- Hinshaw J. E., Carragher B. O., Milligan R. A. 1992. Architecture and design of nuclear pore complex. *Cell.* 69 : 1133—1141.
- Hofmann W., Reichart B., Ewald A., Muller E., Schmitt I., Staber R. H., Lottspeich F., Jockusch B. M., Scheer U., Hauber J., Dabauvalle M. C. 2001. Cofactor requirements for export of Rev response element (RRE) and constitutive transport element (CTE) — containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J. Cell Biol.* 152 : 895—910.
- Holaska J. M., Black B. E., Love D. C., Hanover J. A., Leszyk J., Paschal B. M. 2001. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell Biol.* 152 : 127—140.
- Hood J. K., Casolari J. M., Silver P. A. 2000. Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp 1p/importin-alpha export. *J. Cell Sci.* 113 : 1471—1480.
- Hurt E., Strasser K., Segref A., Bailer S., Schlaich N., Presutti C., Tollervey D., Jansen R. 2000. Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts. *J. Biol. Chem.* 275 : 8361—8368.
- Imreh G., Hallberg E. 2000. An integral membrane protein from the nuclear pore complex is also present in annulate lamellae: Implication for annulate lamellae formation. *Exp. Cell Res.* 259 : 180—190.

- Jakel S., Albig W., Kutay U., Bischoff F. R., Schwamborn K., Doenecke D., Görlich D. 1999. The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* 18 : 2411—2423.
- Jullien D., Görlich D., Laemmli U. K., Adachi Y. 1999. Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extracts requires a novel protein XRIP alpha but not importin alpha. *EMBO J.* 18 : 4348—4358.
- Katahira J., Strass K., Podtelejnikov A., Mann M., Jung J. U., Hurt E. 1999. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* 18 : 2593—2609.
- Kehlenbach R. H., Dickmans A., Kehlenbach A., Guan T., Gerace L. 1999. A role for RanBP1 in the release of Crm 1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J. Cell Biol.* 145 : 645—657.
- Keminer O., Peters R. 1999. Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J.* 77 : 217—228.
- Kiseleva E., Allen T. D., Rutherford S., Bucci M., Wentz S. R., Goldberg M. W. 2004a. Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *J. Struct. Biol.* 145 : 272—288.
- Kiseleva E., Drummond S. P., Goldberg M. W., Rutherford S. A., Allen T. D., Wilson K. L. 2004b. Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Cell. Sci.* 117 : 2481—2490.
- Kiseleva E., Goldberg M. W., Allen T. D., Akey C. W. 1998. Active nuclear complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNA export. *J. Cell Sci.* 111 : 223—236.
- Kiseleva E., Goldberg M. W., Cronshaw J., Allen T. D. 2000. The nuclear pore complex: structure, function and dynamics. *Crit. Rev. Eucar. Gene Exp.* 10 : 101—112.
- Kiseleva E., Goldberg M. W., Daneshmandi B., Allen T. D. 1996. RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore complex. *J. Mol. Biol.* 260 : 304—311.
- Kiseleva E., Rutherford S., Cotter L. M., Allen T. D., Goldberg M. W. 2001. Steps of nuclear pore assembly and reassembly during mitosis in early *Drosophila* embryo. *J. Cell Sci.* 114 : 3607—3618.
- Kohler M., Ansieau S., Prehn S., Leutz A., Haller H., Hartmann E. 1997. Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett.* 417 : 104—108.
- Kutay U., Lipowsky G., Izaurralde E., Bischoff F. R., Schwarzmaier P., Hartmann E., Görlich D. 1998. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell.* 1 : 359—369.
- Lindsay M. 2001. RanBP3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J. Cell Biol.* 153 : 1391—1402.
- Lohka M. J. 1998. Analysis of nuclear envelope assembly using extracts of *Xenopus* eggs. *Methods Cell Biol.* 53 : 367—395.
- Lund E., Dahlberg J. E. 1998. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science.* 282 : 2082—2085.
- Macara I. G. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Micr. Biol. Mol. Biol. Rev.* 65 : 570—594.
- Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L., Melchior F. 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 88 : 97—107.
- Marshall I. C., Wilson K. L. 1997. Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends Cell Biol.* 7 : 69—74.
- Matsuoka Y., Takagi M., Ban T., Yamamoto T., Kondo Y., Yoneda Y. 1999. Identification and characterization of nuclear pore subcomplexes in mitotic extract of human somatic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254 : 417—423.
- Matunis M. J., Coutavas E., Blobel G. 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135 : 1457—1470.
- Maul G. G. 1977. The nuclear and cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution and evolution. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 6 : 175—186.
- Melchior F. 2000. Sumo nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 16 : 591—626.
- Michael W. M., Choi M., Dreyfuss G. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell.* 83 : 415—422.
- Miller B. R., Powers M., Park M., Fischer W., Forbes D. J. 2000. Identification of a new vertebrate nucleoporin, Nup188, with the use of a novel organelle trap assay. *Mol. Cell.* 11 : 3381—3396.
- Moroianu J., Blobel G., Radu A. 1995. Previously identified protein of uncertain function is karyopherin α together with karyopherin β docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 2008—2011.
- Nakielny S., Shaih S., Burke B., Dreyfuss G. 1999. Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. *EMBO J.* 18 : 1982—1995.
- Onischenko E. A., Gubanov N. V., Kiseleva E. V., Halberg E. 2005. Cdk1 and okadaic acid-sensitive phosphatases control assembly of nuclear pore complexes in *Drosophila* embryos. *Moll. Biol. Cell.* 16 : 5152—5162.
- Palmeri D., Malin M. H. 1999. Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 1218—1225.
- Pante N., Kann M. 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 425—434.
- Paschal B. 2002. Translocation through the nuclear pore complex. *Trends Biochem. Sci.* 27 : 593—596.
- Peters C., Mayer A. 1998. Ca²⁺-calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature.* 6711 : 575—580.
- Petersen J. M., Her L. S., Varvel V., Lund E., Dahlberg J. E. 2000. The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 8590—8601.
- Powers M. A., Forbes D. J., Dahlberg J. E., Lund E. 1997. The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is essential components of multiple RNA export pathway. *J. Cell Biol.* 136 : 241—250.
- Rabut G., Ellenberg J. 2004. Automatic real-time three-dimensional cell tracking by fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 216 : 131—137.
- Ribbeck K., Görlich D. 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* 21 : 2664—2671.
- Ribbeck K., Kutay U., Paraskeva E., Görlich D. 1999. The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr. Biol.* 9 : 47—50.
- Ris H. 1997. High resolution field-emission scanning electron microscopy of nuclear pore complex. *Scanning.* 19 : 368—375.
- Rout M. P., Aitchison J. D., Suprapto A., Hjertaas K., Zhao Y., Chait B. T. 2000. The yeast nuclear pore complex. Composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148 : 635—652.
- Rout M. P., Blobel G. 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complexes. *J. Cell Biol.* 123 : 771—783.
- Ryan K. J., Wentz S. R. 2000. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 : 361—371.
- Siebrasse J. P., Peters R. 2002. Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes. *EMBO Rep.* 3 : 887—892.
- Sinioglou S., Lutzmann M., Santos-Rosa H., Leonard K., Mueller S., Aebi U., Hurt E. 2000. Structure and assembly of the Nup84p complex. *J. Cell Biol.* 149 : 41—54.
- Sinioglou S., Wimmer C., Rieger M., Doye V., Tekotte H., Weise C., Emig S., Segref A., Hurt E. C. 1996. A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell.* 84 : 265—275.
- Siomi H., Dreyfuss G. 1995. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.* 129 : 551—560.
- Smith A., Brownawell A., Macara I. G. 1998. Nuclear import of Ran is mediated by NTF2. *Curr. Biol.* 8 : 1403—1406.

- Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E. J. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 24 : 181—185.
- Smitherman M., Lee K., Swanger J., Kapur R., Clurman B. E. 2000. Characterization and targeted of murine Nup50, ap27 (kip1) — interacting component of the nuclear pore complex. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 5631—5642.
- Smythe C., Jenkins H. E., Hutchison C. J. 2000. Incorporation of the nuclear pore basket protein Nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *EMBO J.* 19 : 3918—3931.
- Solbacher J., Maurer P., Vogel F., Schlenstedt G. 2000. Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 8468—8479.
- Stewart M., Kent H. M., McCoy A. J. 1998. Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran. *J. Mol. Biol.* 277 : 635—646.
- Stoffler D., Fahrenkrog B., Aebi U. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 : 391—401.
- Strawn L. A., Shulga N., Goldfarb D. S., Wentz S. R. 2004. Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat. Cell. Biol.* 6 : 197—206.
- Taura T., Krebber H., Silver P. A. 1998. A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 7427—7432.
- Teixeira M. T., Fabre E., Dujon B. 1999. Self-catalyzed cleavage of the yeast nucleoporin Nup145 precursor. *J. Biol. Chem.* 274 : 32 439—32 444.
- Truant R., Kang Y., Cullen B. R. 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 1210—1217.
- Tsuji L., Takumi T., Imamoto N., Yoneda Y. 1997. Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 416 : 30—34.
- Ullman K., Powers M., Forbes D. 1999. The nucleoporin Nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 649—664.
- Vasu S. K., Forbes D. J. 2001. Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 : 363—375.
- Von Kobbe C., van Deuren J. M., Rodrigues J. P., Sitterlin D., Bachi A., Wu X., Wilm M., Carmo-Fonseca M., Izaurraide E. 2000. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol. Cell.* 6 : 1243—1252.
- Walther T. C., Alves A., Pickersgill H., Loiodice I., Hetzer M., Galy V., Hulsmann B. B., Kocher T., Wilm M., Allen T., Mattaj I. W., Doye V. 2003. The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell.* 113 : 195—206.
- Walther T. C., Pickersgill H. S., Cordes V. C., Goldberg M. W., Allen T. D., Mattaj I. W., Fornerod M. 2002. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J. Cell Biol.* 158 : 63—77.
- Weighardt F., Biamonti G., Riva S. 1995. Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J. Cell Sci.* 108 : 545—555.
- Weis K., Mattaj I. W., Lamond A. I. 1995. Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science.* 268 : 1049—1053.
- Welch K., Franke J., Kohler M., Macara I. G. 1999. RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 8400—8411.
- Winey M., Yarar D., Giddings T. H., Mastronarde J., Mastronarde D. N. 1997. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 2119—2132.
- Yang Q., Rout M. P., Akey C. W. 1998. Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell.* 1 : 223—234.

Поступила 21 III 2006

STRUCTURAL ORGANIZATION, FUNCTIONS AND DYNAMICS OF NUCLEAR PORES

N. V. Gubanova,¹ K. N. Morozova, E. V. Kiseleva²Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk;
e-mail: ¹ nat@bionet.nsc.ru; ² elka@bionet.nsc.ru

This review summarized data on the morphological and biochemical analysis of nuclear pore complexes, which are complex organelles providing the route of passive and active nuclear-cytoplasmic transport to different molecules in the eukaryotic cell. The morphology and functional role of nuclear pores in higher and lower eukaryotes, and molecular aspects of the import and export of molecules from the nucleus are described in addition to factors involved in the regulation of these process. Special attention has been paid to sequential steps of the nuclear pore assembly *in vitro* and *in vivo*.

Key words: nuclear pores, nuclear-cytoplasmic transport, nuclear pore dynamic, mitosis.