

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Proces degradace laminových struktur po zahájení  
meiotického zrání v myším oocytu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Šárka Prokešová**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Proces degradace laminových struktur po zahájení meiotického zrání v myším oocytu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.04.2015

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce, paní prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D., svému školiteli panu Ing. Andreji Šušorovi, PhD., dále pak panu Ing. Michalu Kubelkovi, CSc., paní Ing. Denise Jansové, paní Jaroslavě Šupolíkové a celé laboratoři Biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie Věd České Republiky za pomoc při realizaci a zpracování práce, za odborné rady a trpělivost a v neposlední řadě za podporu, bez které by práce nemohla vzniknout.

# Proces degradace laminových struktur po zahájení meiotického zrání v oocytu

## Souhrn

Po vystoupení oocytu z prvního meiotického bloku v profázi I dochází k rozpadu jaderné membrány, v tomto procesu se postupně zvyšuje propustnost vlivem oddělování komponentů jaderné membrány, jako jsou proteiny asociované na jaderné póry, nebo laminy asociované s vnitřní jadernou membránou. Laminy jsou důležitými faktory v udržování buněčné i jaderné integrity, organizace chromatinu v jádře, při transkripční kontrole ale také při vzniku aneuploidií. Zdá se však, že laminy hrají významnou roli i v dynamice a průběhu meiotického zrání. Cílem práce bylo ověřit hypotézu, zda nerozpoznané laminové struktury po NEBD (nuclear envelope break down, rozpad jaderného obalu) vytvářejí mechanické bariéry a jsou důležité pro frakcionaci cytoplazmy během meiotického zrání. Tato hypotéza byla ověřována na základě sledování dynamiky Laminu A / C v průběhu meiotického zrání u oocytů myši ve stáří od 4 do 18 týdnů (mladé) a u oocytů myši starších jednoho roku (staré). Pomocí imunoblottingu byla nejdříve u oocytů v různých časových úsecích po výstupu z meiotického bloku zjišťována přítomnost fosforylovaného Laminu A / C a depolymerizovaných Laminů A a C. Následně byla imunocytochemickou metodou zjišťována přítomnost mechanických bariér u obou sledovaných skupin oocytů po rozpadu jaderné membrány. Pomocí konfokální mikroskopie a live cell imaging bylo následně potvrzeno, že existují statisticky významné rozdíly v dynamice meiotického zrání a chování laminových struktur mezi oběma skupinami oocytů. U mladých oocytů dochází po znovuzahájení meiózy k fosforylaci Laminů A / C a rozpadu jaderné membrány statisticky významně později, než u starých oocytů. Mechanická bariéra tvořená asociovanými Laminami A / C a endoplazmatickým retikulem se u mladých oocytů formuje po NEBD a mizí v prometafázi I. V oocytech starých myši dochází k rychlejší fosforylaci Laminů A/C po vystoupení z prvního meiotického bloku, a také k rychlejší fragmentaci a rozpadu jaderné membrány. Mechanické bariéry lokalizované po rozpadu jaderné membrány mizí dříve, než u mladých oocytů a dochází také k časnějšímu vydělení prvního pólového tělíska. Dle těchto výsledků lze uvažovat o úloze laminových struktur v dynamice meiotického zrání v závislosti na věku matek, ale také o jejich úloze při vzniku aneuploidií, jejichž frekvence se zvyšuje s věkem matky a tedy se stářím oocytů.

**Klíčová slova:** jaderná membrána, oocyt, laminy, meióza, aneuploidie

# **The process of degradation of lamin structures after the initiation of meiotic maturation of the oocyte**

## **Summary**

After the oocyte gets of the first meiotic block in prophase I, nuclear membrane decays. In this process, the throughput gradually increases due to the separation of nuclear membrane components, such as proteins associated to nuclear pores or laminas associated with inner nuclear membrane. Laminas are important factors in maintenance of cell and nuclear integrity, organization of chromatin in the nucleus, at the transcriptional control but also when aneuploidy arises. However, it seems that the laminae play an important role in the dynamics and process meiotic maturation. The purpose was to test the hypothesis, if the unrecognized lamina structures after NEBD (nuclear envelope break down), create a mechanical barrier and if they are important for fractionation cytoplasm during meiotic maturation. This hypothesis was tested by monitoring the dynamics of lamin A / C during meiotic maturation of mice oocytes. Mice were 4-18 weeks old (young) and other were older than one year. Using immunoblotting, the presence of phosphorylated lamins A / C and depolarized Lamins A and C was detected in oocytes at different time intervals after exit from meiotic block. Then was detected the presence of mechanical barriers of both groups of oocytes after the decay of the nuclear membrane. It was done by immunocytochemical method. Using confocal microscopy and live cell imaging was subsequently confirmed that there were statistically significant differences in the dynamics of meiotic maturation and behavior lamina structures between the two groups of oocytes. In young oocytes, after resumption of meiosis to the phosphorylation of lamin A / C and the decay of the nuclear membrane occurs significantly later than the old oocytes. Mechanical barrier formed by associated lamin A / C and endoplasmic reticulum is in young oocytes formed after NEBD and disappear in prometaphase I. There is faster phosphorylation of lamin A / C after leaving the first meiotic block in the old mouse oocytes and also faster fragmentation and disintegration of the nuclear membrane. Mechanical barriers localized after decay of nuclear membrane disappears earlier than in young oocytes and also dividing of the first polar corpuscle is earlier. Based on these results the role of lamina structures in the dynamic of meiotic maturation depending on the age of mothers can be considered. Their role in the rise of aneuploidy, whose frequency increases with maternal age and therefore the age of oocytes can be considered too.

**Key words:** nuclear membrane, oocyte, lamins, meiosis, aneuploidy

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Vědecká hypotéza a cíl práce.....	2
3. Literární přehled.....	3
3.1. Laminy – jaderné strukturální bílkoviny .....	3
3.1.1. Strukturální vlastnosti laminů .....	5
3.1.1.1. Struktura zralých (maturovaných) laminů.....	5
3.1.1.2. Posttranskripční modifikace .....	9
3.1.1.3. Posttranslační modifikace.....	10
3.1.2. Funkční vlastnosti laminů.....	12
3.1.2.1. Udržování jaderné integrity.....	12
3.1.2.2. Interakce s chromatinem .....	13
3.1.2.3. Interakce s transmembránovými proteiny .....	13
3.1.2.4. Organizace jaderných pórů (NPCs) .....	15
3.1.2.5. Organizace cytoskeletu .....	16
3.1.2.6. Regulace genové exprese .....	19
3.1.3. Dynamika laminů během interfáze somatických buněk.....	22
3.1.3.1. Dynamika laminů integrovaných do jaderné membrány .....	22
3.1.3.2. Dynamika laminů v intranukleárních ložiscích .....	23
3.1.3.3. Dynamika disperzních nukleoplazmatických laminů .....	25
3.1.4. Dynamika laminů během mitotického dělení somatických buněk .....	26
3.1.4.1. Rozpad jaderných laminů .....	26
3.1.4.2. Opětovné složení laminů .....	27
3.1.5. Dynamika laminů v oocytech v průběhu meiotického zrání .....	29
3.1.6. Dynamika laminů v průběhu embryonálního vývoje.....	31
3.1.7. Laminy v průběhu apoptózy .....	33
4. Materiály a metody.....	36

4.1.	Materiál.....	36
4.1.1.	Experimentální skupiny.....	36
4.1.2.	Získání vaječníků a oocytů .....	36
4.1.3.	Média použitá pro <i>in vitro</i> zrání myších oocytů.....	36
4.1.4.	Pracovní média a protilátky pro imunolokalizaci .....	38
4.1.5.	Materiály a média pro imunoblotting.....	39
4.2.	Metody.....	41
4.2.1.	Izolace a <i>in vitro</i> kultivace oocytů .....	41
4.2.2.	Imunolokalizace laminu A/C .....	41
4.2.3.	Live cell imaging .....	41
4.2.4.	Elektroforetická separace .....	42
4.2.5.	Imunochemická detekce proteinů v gelu – western blot .....	42
4.2.6.	Fotokomora.....	43
4.2.7.	Test kinázové aktivity .....	43
4.2.8.	Vyhodnocení experimentů.....	43
5.	Výsledky .....	45
6.	Diskuse .....	55
7.	Závěr.....	58
8.	Seznam literatury .....	59

# 1. Úvod

Jaderný obal a jeho dynamika v průběhu meiotického zrání přitahuje v posledních desetiletích stále větší pozornost. I když biologický význam jaderné membrány v somatických buňkách je zřejmý, až v posledních letech bylo zjištěno, že rostoucí seznam lidských dědičných chorob souvisí s proteiny jaderné membrány, zejména s nukleárními laminy, proteiny vnitřní jaderné membrány a komplexy jaderných pórů. Tyto choroby se označují jako laminopatie nebo envelopathie. Vzhledem k pokrokům v proteomice a sekvenování se velmi omezený počet charakterizovaných jaderných proteinů výrazně rozšířil. Spolu s lepšími biochemickými a genetickými znalostmi jaderné membrány umožnily pokročilé zobrazovací metody lepší pochopení její dynamiky v živých somatických buňkách a stále častěji také v zárodečných buňkách.

Většina našich znalostí o biochemii jaderné membrány a s ní spojených nukleárních laminů v průběhu meiotického zrání však vychází z meiotických *in vitro* systémů oocytů hvězdic (*Patiria miniata*), oocytů drápatky vodní (*Xenopus laevis*) a hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*). Nicméně naše porozumění dynamice jaderné membrány v průběhu meiotického zrání a s tím spojená dynamika jaderných laminů v takových buňkách je omezenější, než naše znalosti dynamiky v somatických buňkách. V poslední dekádě studie využívající oocyty, které jsou ideální pro sledování průběhu dynamické změny ve struktuře jaderné membrány a laminů v G2 / M fázi *in vivo* ukázaly, že se funkce liší od somatických savčích buněk. Zároveň bylo na myších modelech zjištěno, že se zvyšujícím se věkem matek se také zvyšuje výskyt aneuploidií ve zkoumaných oocytech. V této práci se budeme snažit shrnout poznatky o laminových proteinech z mitotických a meiotických systémů, poukázat na jejich rozdíly a jedinečné vlastnosti a objasnit základní otázky dynamiky jaderných laminů v průběhu meiotického zrání v závislosti na stáří jedinců.



## **2. Vědecká hypotéza a cíl práce**

Na základě dostupných údajů z odborné literatury byla stanovena hypotéza, že nerozpoznané laminové struktury po NEBD vytvářejí mechanické bariéry a jsou důležité pro frakcionaci cytoplasmy během meiotického zrání. Cílem této práce je ověření hypotézy pomocí sledování lokalizace laminu A/C v oocytech myši starších jednoho roku a v oocytech myši do věku 18 týdnů v průběhu meiotického zrání.

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Laminy – jaderné strukturální bílkoviny

Vlastnosti eukaryotických buněk jsou definovány jejich jádrem, které je odděleno od cytoplazmy jadernou membránou (NE, nuclear envelope). Jaderná membrána je složena ze dvou vrstev, vnější (ONM, outer nuclear membrane) a vnitřní (INM, inner nuclear membrane) jaderné membrány. Ty jsou mezi sebou odděleny takzvanou lumenální plochou, která má přibližně šířku 100 nm. Jadernou membránu je také možno rozlišit na základě tří odlišných struktur, samotné jaderné membrány, komplexů jaderných pórů (NPC, nuclear pore complex), a nukleární vrstvy laminů (Gerace and Blobel, 1990; Broers et al., 2005). Vnější část jaderné membrány je spojená a sdílí biochemické a funkční vlastnosti s endoplazmatickým retikulem (ER). Naproti tomu vnitřní jaderná membrána je odlišná a je charakterizována množstvím integrálních membránových proteinů, nazývaných transmembránové proteiny (NET, nuclear envelope transmembrane proteins), které jsou do ní integrovány během interfáze (Schirmer et al., 2001). Mezi tyto proteiny, které zároveň interagují s laminy, se řadí i LAP2s (lamin-associated polypeptide), Emerin, MAN1, Nesprin a SUN. Komplexy jaderných pórů (NPC), které regulují průchod makromolekul mezi cytoplazmou a jádrem, přerušují po celé délce jadernou membránu. Pod vnitřní membránou se nachází nukleární vrstva laminů (Goldberg et al., 1999; Broers et al., 2005).

Laminy jsou strukturální proteiny, které patří k V. typu proteinové rodiny intermediálních filament. Tvoří proteinovou síťovinu a obložení nukleoplasmatické plochy vnitřní jaderné membrány. Tato síťovina se skládá z jednoho nebo více propojených strukturálních proteinů, laminů, které hrají významnou roli v organizaci nukleární architektury (Gerace, 1986; Broers et al., 2006). Laminy se však nenacházejí jen na nukleární periférii, ale také volně uvnitř jádra, v takzvaných nukleoplazmatických ložiskách a dále také jako již zmíněná síťovina v celém prostoru jádra (Moir et al., 2000). V savcích somatických buňkách jsou tři hlavní typy laminů - A, B a C – a jsou jasně odlišitelné (Gerace and Blobel, 1980). Laminy A a C jsou odvozeny alternativním sestřihem pre-mRNA kódující LMNA gen (Lin and Worman, 1993). Neméně důležité jsou i B1 a B2 laminy, které jsou kódovány odlišnými geny, než Laminy A/C, jsou to geny LMNB1 a LMNB2 (Peter et al., 1990; Vorbürger et al., 1989; Krohne et al., 1989). Také existují důkazy o dalším menším laminovém polypeptidu u ptáků (Lehner et al., 1987). Stejně jako savčí Lamin A a Lamin C, které se liší jen v jejich COOH-

terminální ocasové doméně, by mohly vzniknout ze stejného přepisu diferenciálním sestřihem (McKeon et al. 1986; Fisher et al. 1986).

Expresi odlišných typů laminů regulují různé genové programy a cytoplazmatické proteiny intermediálních filament (Benavente et al 1985; Quinlan et al., 1985; Osborn et al., 1985; Stewart and Burke, 1987; Lehner et al., 1987). Specifická exprese různých laminů podle buněčného typu byla poprvé uvedena u drápatky vodní (Krohne and Benavente, 1986). Dále například u raného myšního embrya v období od blastocysty, kdy podle Stewart a Burke (1987) dochází k expresi pouze laminu B.

Laminy tedy patří mezi hlavní komponenty jaderné membrány a poruchy, související s laminy, jsou spojené s abnormální lobulací jaderné membrány (Goldman et al., 1992). Mutace proteinů jaderné membrány, laminů nebo NPC proteinů tedy vede k široké škále dědičných onemocnění, souhrnně nazývané buď jaderné envelopathie, pokud mutace vznikají v INM nebo NPC proteinech (Nagano and Arahata, 2000; Burke et al., 2001; Somech et al., 2005), nebo laminopatie, což jsou mutace vznikající v laminech (Burke and Stewart 2002, Gruenbaum et al., 2005). Změny v expresních vzorech laminů jsou rovněž zapojeny do progresu nádorů (Broers et al., 1997; Ramaekers et al., 2003). Je zřejmé, že asociace proteinů jaderné membrány může mít za následek širokou škálu onemocnění a tyto proteiny plní důležité funkce ve fyziologickém vývoji mnoha různých typů tkání. Laminopatie patří do rychle rostoucí skupiny chorob, které jsou způsobené abnormalitami ve struktuře nebo úpravách laminu A/C (LMNA) genu. Mutace nebo nesprávné zpracování je příčinou více než tuctu různých dědičných chorob, od onemocnění příčně pruhovaných svalových vláken, přes onemocnění tuků a periferních nervových buněk, dále lipodystrofický syndrom, periferní neuropatie, progeroidní syndromy a také vytváří podmínky, které vedou k vážným vývojovým vadám a abortům. Usuzuje se, že laminy se zdají být jedním z klíčových faktorů, mimo jiné i v kontrolním procesu stárnutí buněk, protože poruchy ve struktuře laminových bílkovin vedou k několika formám předčasného stárnutí (Somech et al., 2005).

Mnohé proteiny jaderné membrány, stejně jako laminy, mají rozdílné profily exprese během vývoje a byly u nich prokázány řady buněčných funkcí. Laminy, které jsou velice významné, komunikují a také zřejmě stabilizují několik dalších strukturálních proteinů jaderné membrány, jako je například Emerin a Nesprin. Také vhodná distribuce komplexů jaderných pórů v jaderné membráně je udržována laminy (Hutchison, 2002).

Jaderná membrána a s ní spojené laminy jaderné vrstvy (jaderná lamina) jsou také zodpovědné za řízení jaderných funkcí, včetně genové exprese, prostřednictvím interakce s chromatinem a také se podílí na jeho organizaci (Malhas and Vaux, 2009). Dimerizace laminů s jadernými proteiny mitotického aparátu (NUMA), stabilizovaná pomocí RNA, by mohla určit chromatinovou organizaci vyššího řádu (Barboro et al., 2003). Dále laminy přispívají ke správné buněčné činnosti, včetně replikace, transkripce, a opravy DNA (Moir et al., 1994; Dechat et al., 2008; Dechat et al., 2010; Redwood et al., 2011). Poměrně nedávné studie ukazují, že Laminy B jsou stálé komponenty jaderného interiéru, oproti tomu Laminy A/C jsou dynamičtější (Tang et al., 2008; Shimi et al., 2008). Studie Tang et al. (2008) potvrdila, že Lamin A/C zvyšuje mobilitu, jestliže nukleární laminy obsahují nízké úrovně Laminu B1. Další aspekt, který by měl být vzat v úvahu, je vnitřní pozice laminů (Hozák et al., 1995), které mohou být součástí jaderné matrix (Barboro et al., 2010).

### **3.1.1. Strukturální vlastnosti laminů**

Nukleární laminy byly původně definovány jako fibrilární složka jádra (Pappas, 1956), která je rezistentní vůči detergentům a solím (Dwyer and Blobel, 1976). Následující biochemické a imunohistochemické výzkumy ukázaly, že hlavní komponenty jaderné vrstvy proteinů z krysích jater byly polypeptidy migrující mezi 65 a 70 kDa v SDS-polyakrylamidovém gelu, tyto polypeptidy byly nazvány laminy. Během jaderného dělení jsou depolymerizovány a podle typu laminového polypeptidu se chovají dvěma odlišnými způsoby: laminy s relativní molekulovou hmotností 70 (Lamin A) a 65 kDa (Lamin C) jsou volně rozpustné dimery a jsou označovány jako Laminy typu A. Naproti tomu laminy s molekulovou hmotností 67 (Lamin B1) a 68 kDa (Lamin B2) zůstávají spojené s membránou a jsou označovány jako Laminy typu B (Gerace et al., 1978; Gerace and Blobel, 1980). Po podrobném zkoumání struktury laminů z GV oocytů drápatky vodní bylo zjištěno, že se vrstva skládá z vláken o rozměrech intermediálních filament (Aebi et al., 1986). Následně klonování a sekvenování potvrdilo, že laminy jsou skutečně členy IF (intermediální filamenta) supergenové rodiny a byly klasifikovány jako typ V IF rodiny (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986).

#### **3.1.1.1. Struktura zralých (maturovaných) laminů**

Laminy se tedy řadí mezi proteiny intermediálních filament, které mají poměrně dobře definovanou strukturu, skládající se z:

- variabilní NH<sub>2</sub>-terminální globulární domény neboli koncové hlavové domény
- centrální  $\alpha$ -helikální tyčové domény, obsahující čtyři svinuté domény 1A, 1B, 2A a 2B (cívky), které jsou odděleny spojovacími regiony L1, L12, a L2
- globulární COOH – terminální domény, neboli takzvané koncové ocasové domény, obsahující jaderný lokalizační signál, imunoglobulinovou doménu a CAAX box (specifická sekvence pro fernesylaci, není přítomna u Laminu C)

Stočené (svinuté) domény 1A, 1B, 2A a 2B, které jsou součástí centrální tyčové domény, jsou uspořádány kolem dokola v heptanovém (hepta = 7) opakování (Quinlan et al., 1985; Conway and Parry, 1990; Herrmann et al., 2007). Uvnitř svinuté 1B domény je navíc 42 aminokyselinových zbytků (6 heptadů = 6 x 7), které nejsou přítomny v jiných proteinech intermediálních filament (Fisher et al., 1986, McKeon et al., 1986). Stočené domény tvoří provazcovité struktury, a v laminech tyto domény tvoří dimery v délce ~ 50 nm (Aebi et al., 1986). Spojovací regiony, které propojují svinuté domény, mají vysoce stabilní sekvence, což nasvědčuje jejich důležité úloze ve struktuře a funkci laminů (Conway and Parry, 1990). Zdá se, že ve všech typech intermediálních filament má L2 spojovací region poměrně pevnou konformaci (North et al., 1994). Naproti tomu spojovací region L12 se zdá být relativně flexibilní a může sloužit jako "závěs" mezi stočenými doménami jednotlivých intermediálních filament (Smith et al., 2002). Předpokládá se, že spojovací region L1, nejvíce flexibilní oblast intermediálních filament typu I – IV (Smith et al., 2002), je u laminů poměrně pevný a zdá se, že přijímá  $\alpha$ -helikální konformaci, podobnou spojovacímu regionu L2 (Parry and Steinert, 1995).

V porovnání s ostatními intermediálními filamenty globulární hlavová doména laminů je kratší, než v jiných IF bílkovinách, například 28 – mi zbytková globulární hlavová část Laminu A (A a C) je vysoce kladně nabitá. To samé platí pro COOH – terminální ocasovou doménu, což naznačuje, že obě oblasti jsou důležité pro interakce mezi jednotlivými molekulami proteinů. Podrobnější studie (Dhe – Paganon et al., 2002; Krimm et al., 2002) ukázaly, že globulární COOH – terminální doména Laminů A obsahuje ~116 zbytků aminokyselin. Těchto 116 zbytků je složeno do devíti  $\beta$  – řetězců. Jádro této globulární oblasti je tvořeno hydrofobními zbytky, zatímco většina nabitých zbytků se vyskytuje na povrchu molekuly (Krimm et al., 2002), což umožňuje interakce s jinými (ne laminovými) proteiny nebo DNA (Stierle et al., 2003).

Mezi COOH – terminální doménou a imunoglobulinovou doménou obsahují Laminy A a B sekvenci jaderného lokalizačního signálu, který není přítomen u jiných proteinů intermediálních filament (Frangioni and Neel, 1993). Mutace jaderného lokalizačního signálu vede k aberantní integraci laminů v cytoplazmě (Loewinger and McKeon, 1988; Zwerger and Medalia, 2013).

Laminy jsou obligátní dimery, i když stále ještě není přesně jasné, zda laminy tvoří homodimery nebo heterodimery (Gruenbaum et al., 2002). Studie ukazují, že Laminy typu A a Laminy typu B se přednostně sestavují do homopolymerů, tvořených buď Laminy typu A nebo B (Delbarre et al., 2006). Dimerizace nastává paralelním sdružením v rámci stočených domén v regionu centrální tyčové domény (Aebi et al., 1986). Podrobné srovnání krystalové struktury stočené domény 2B a Vimentinu (protein intermediálních filament III) odhalila významné rozdíly v distribuci nabitých zbytků a jiný vzor intrahelikálních a interhelikálních solných můstků. Tyto studie naznačují, že laminy a Vimentin mohou podstupovat různé integrační dráhy *in vivo* (Strelkov et al., 2004). Laminové dimery jsou bohužel *in vitro* silně náchylné k sdružení hlavových a ocasových domén (head – to – tail), které vede k tvorbě protofilament (Heitlinger et al., 1991; Moir et al., 1991; Heitlinger et al., 1992). Tvorba tohoto spojení je polymerací druhého řádu a dochází k tvorbě tetramerů, ve kterých dochází k nelineárnímu sdružení dvou laminových dimerů vytvořených překrytím části COOH – terminální části stočené domény 2B a NH<sub>2</sub> – terminální části této stočené domény, zprostředkované elektrostatickou interakcí mezi těmito dvěma stočenými částmi (Strelkov et al., 2004). Na další úrovni organizace polymeru laminových filament se předpokládá vytvoření antiparalelního sdružení tak, že jednotlivé tetramery obsahují oba NH<sub>2</sub> – terminální a COOH – terminální přesahy (Stuurman et al., 1998).

Jedním z důvodů, proč je obtížné sestavit laminy do 10 nm filament bez překryvů *in vitro* je, že vysoce nabitě globulární hlavové a ocasní domény silně interagují mezi sebou a tyto interakce se jeví jako upřednostňované, dochází tedy k posunu směrem k tvorbě head – to – tail polymerů. Odstraněním globulární hlavové a v menší míře také ocasové domény se inhibuje tvorba head – to – tail polymerů (Heitlinger et al., 1992). Za určitých okolností *in vitro* laminy postrádající ocasovou doménu stále tvoří laminové polymery (Gieffers and Krohne, 1991). Imunoglobulinová doména laminů také přispívá k vytvoření laminového polymeru, protože překřížené proteinové fragmenty, které obsahuje tato doména, inhibují integraci laminů u drápatky vodní. Jediná bodová mutace v tomto záhybu je dostatečná k

odstranění této dominantní negativní funkce imunoglobulinového přehybu (Shumaker et al., 2005).

Konstituce jaderných laminů je stále předmětem diskuse. Zatímco u drápatky vodní je pod jadernou membránou viditelná 10 nm mřížka laminových filament, vrstva v savčích buňkách, jako jsou fibroblasty, se zdá mít velmi variabilní tloušťku a jejich molekulární organizace je stále nejasná. To by mohlo znamenat, že kromě tvorby filament existují i jiné typy organizace, jako jsou například parakrystaly (Herrmann and Aebi, 2004). Zatímco na nižších úrovních organizace polymerů jsou vytvořeny nejpravděpodobněji homopolymery spíše než heteropolymery (Delbarre et al., 2006), je zřejmé, že v jádrech většiny buněk jsou alespoň čtyři různé molekulární struktury, sestávající z Laminu A, Laminu C, Laminu B1 a Laminu B2, které na sebe vzájemně působí. Po komplikovanější analýze struktury laminů bylo prokázáno, že se vazebné interakce laminů *in vitro* významně liší mezi jednotlivými partnery. Zatímco může existovat poměrně silná vazba mezi Laminou A, C, a B1, interakce s Laminou B2 se zdá být mnohem slabší, zatímco i B2 – B2 interakce jsou slabší než jiné kombinace. To naznačuje, že charakteristická kombinace interakce heterotypického laminu ovlivňuje stabilitu laminového polymeru (Schirmer and Gerace, 2004).

Vzhledem k tomu, že Laminou B jsou nezbytné a jeden nebo více Laminů B jsou exprimovány ve všech buňkách, bylo navrženo, že jsou základními stavebními kameny laminů. Tomu nasvědčují tyto důkazy:

- Při zpětném znovusestavení jaderné membrány v telofázi se objeví Laminou typu B v nukleární vrstvě dříve, než Laminou typu A (Moir et al., 2000).
- V jaderných bezbuněčných systémech je inkorporace Laminu A do nukleární vrstvy závislá na přítomnosti Laminu typu B (Dyer et al., 1999).
- Laminou typu A jsou relativně mobilní a mohou migrovat mezi nukleární vrstvou a nukleoplazmou, zatímco Laminou typu B jsou obvykle pevně spojeny s nukleární vrstvou (Broers et al., 1999; Moir et al., 2000).
- Myší modely, ve kterých byl gen LMN A upraven tak, že se exprimoval jen Lamin C ukázaly, že tato transgenní zvířata mají zcela normální vývoj (Fong et al., 2006).

Dynamické chování laminů během interfáze a mitózy může také částečně tvořit základ alespoň některých z patologií pozorovaných u nemocí způsobených Laminy A / C.

### **3.1.1.2. Posttranskripční modifikace**

Jednotlivé druhy laminů jsou odvozené od alternativně sestříhaných produktů jediného 12. exonu genu, který se nachází na chromozomu 1q21.1-21.3 a je nazván LMNA (Lin and Worman, 1993; Wydner et al., 1996). Byly popsány čtyři různé proteiny jako alternativně sestřížené produkty genu LMNA. Laminy A a C jsou hlavními produkty genu LMNA ve většině diferencovaných buněk (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986; Herrmann et al., 2007). Lamin C je totožný s Laminem A až do kodónu 566, po kterém postrádá část exonu 10, jakož i exony 11 a 12, ale disponuje pěti unikátními zbytky aminokyselin na svém COOH-terminálním konci. Lamin A má takzvanou zvláštní ocasovou doménu Laminu A, která je odvozena od aminokyseliny v pozici 567 – 664, obsahující COOH – terminální CAAX motiv (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986). Tento motiv nesou i Laminy B. Lamin B1 je zdánlivě jedinečný produkt 11 exonu genu LMNB1 a nachází se na chromozómu 5q23.3-q31.1 (Lin and Worman, 1995). Gen LMNB2, který se nachází na chromozómu 19p13.3 (Biamonti et al., 1992), má dva produkty alternativního sestříhu: Lamin B2, který je exprimován ve většině buněk (Broers et al., 1997), a Lamin B3, který je exprimován pouze ve spermatocytech (Furukawa and Hotta, 1993). Lamin A $\Delta$ 10 je alternativně spojený produkt, který postrádá všechny zbytky exonu 10 a byl zjištěn v nádorových buněčných liniích, stejně jako u několika běžných typů buněk (Machiels et al., 1996). Lamin C2 je specifický zárodečný produkt LMNA (Furukawa et al., 1994).

Počet laminových polypeptidů nacházejících se v různých mnohobuněčných organismech se tedy liší (Weber et al., 1991). Obecně platí, že u obratlovců dochází k odlišné expresi různých druhů laminů v somatických, zárodečných a embryotických buňkách. Naproti tomu u členovců a bezobratlých dochází k expresi pouze jednoho nebo dvou typů laminů (Hutchison, 2002). Lidé mají tři odlišné laminové geny, které kódují sedm různých proteinů.

Laminy typu A a B se liší nejen v jejich chování při mitóze, ale také v jejich expresi. U ptáků, obojživelníků a savců jsou Laminy B1 a B2 exprimovány ve většině buněk jak u embryí, tak u dospělých zvířat (Benavente et al., 1985; Lehner et al., 1987). Exprese Laminů typu B je zásadní pro jadernou integritu, přežívání buněk a normální vývoj (Len-Bohme et al., 1997; Liu et al., 2000; Harborth et al., 2001; Vergnes et al., 2004). Narozdíl od typu B,



Laminy typu A jsou odlišně exprimovány, a jejich obsah v každém buněčném typu obvykle koreluje s diferenciací (Benavente et al., 1985; Lehner et al., 1987; Rober et al., 1989; Broers et al., 1997). U myši jsou Laminy typu A postradatelné pro vývoj, i když LMNA - / - myši nepřezijí déle než 8 týdnů (Sullivan et al., 1999). Stejně tak lidé, kterým chybí funkční Laminy typu A, buď zemřou v děloze, nebo brzy po porodu (Muchir et al., 2003; Van Engelen et al., 2005), zatímco kultivované buňky postrádající Laminy A a C je možné dělit docela adekvátně (Harborth et al., 2001). Laminy typu B jsou tedy nezbytné pro přežití buněk, to dalo podnět k představě, že jsou základní stavební kameny nukleární vrstvy laminů, zatímco Laminy typu A mají více zvláštních funkcí (Hutchison et al., 2001).

### 3.1.1.3. Posttranslační modifikace

Laminy jsou jediné IF proteiny, které vlastní sekvenci jaderného lokalizačního signálu a také CAAX boxu (chybí u Laminu C), který je místem některých posttranslačních modifikací (Krohne et al., 1989; Vorbürger et al., 1989). Posttranslační modifikace globulární hlavové a ocasové domény je vyžadována pro integraci laminů do nukleární vrstvy (Herrmann et al., 2007).

Laminy podstupují posttranslační fosforylaci v průběhu interfáze a při mitóze. Obsahují Cdk1 (Cyklin – dependentní kináza 1) cílové sekvence v globulárních hlavových, i ocasových doménách. Obě z těchto sekvencí jsou v blízkosti koncových oblastí centrální tyčové domény (Peter et al., 1990; Ward and Kirschner, 1990). Obě sekvence jsou fosforylovány mitotickými kinázami nebo Cdk1 přímo jak *in vivo*, tak *in vitro*, a fosforylace těchto míst je v korelaci s disociací laminových filament (Peter et al., 1991; Zwerger and Medalia, 2013).

Kromě toho, substituce Serinu na Arginin v těchto místech blokuje mitotickou disociaci laminových filament *in vivo* (Heald and McKeon, 1990). Zatímco kompletní disociace laminů během mitózy je pravděpodobně zprostředkována fosforylací dvou Cdk1 cílových sekvencí, existují i další cílové sekvence proteinkináz v rámci laminové ocasové domény. Cílová sekvence proteinkináz v oblasti ocasní domény Laminu B1 je oblast, kde dochází ke změně jaderné  $\beta$ II proteinkinázy C (PKC) během interfáze a mitózy, a fosforylace na tomto místě také destabilizuje laminová filamenta (Collas et al., 1997). Fosforylace druhého fosfoakceptoru na místě přilehlém k Cdk1 sekvenci v hlavové oblasti také destabilizuje laminová filamenta (Stuurmann, 1997). Fosforylace těchto dalších míst v průběhu interfáze může omezit head – to – tail vazby mezi laminovými dimery, a proto umožňuje správnou

integraci laminových filament. V této souvislosti je také významná kotevní protein kináza A (AKAP149), která tvoří komplex na INM, zachytávající fosfatázu 1 (PP1). Přitahování PP1 k INM je nezbytné pro opětovné sestavení laminů na konci mitózy (Steen et al., 2000), jakož i k zachování integrity jaderné membrány během interfáze (Steen et al., 2003). Proto se zdá pravděpodobné, že souhra mezi  $\beta$ II PKC a PP1 zajišťuje správné sestavení laminových filament *in vivo*. Ačkoliv souhra mezi  $\beta$ II PKC a PP1 může být důležitá pro sestavení 10 nm vláken, jsou potřeba další posttranslační modifikace pro zajištění integrace jaderných laminů na INM.

Všechny ostatní laminy, kromě Laminu C, obsahují COOH – terminální motiv obsahující Cystein, dvě alifatické aminokyseliny, a libovolnou COOH – terminální aminokyselinu, tento komplex se nazývá CAAX box. CAAX Box je cílem pro sled změn, které vedou k isoprenylaci a methylaci cysteinového COOH-terminálního zbytku. K přidání 15 – ti uhlíkového Farnesyl – isoprenoidu k Cysteinu dochází nejprve v nukleoplazmě a je následováno proteolytickým štěpením (Wolda and Glomset, 1988; Farnsworth et al., 1989; Vorburger et al., 1989; Beck et al., 1990; Glomset et al., 1990; Sinensky et al., 1994).

Po tomto štěpení je cysteinový zbytek modifikován methylací (Sinensky et al., 1994). Isoprenylace a methylace na COOH – terminálních cysteinových zbytcích jsou modifikace nezbytné pro lokalizaci Laminu typu A a Laminu typu B v INM. Avšak poté se na INM osudy Laminů typů A a B liší. Lamin A obsahuje další místo pro štěpení endoproteázou, která štěpí 15 aminokyselin před COOH – terminálním cysteinovým zbytkem. Tato endoproteáza se nazývá zinková metaloproteináza ZMPSTE24. Zatímco Laminy typu B zůstávají isoprenylovány po celou dobu jejich životnosti, čímž jsou permanentně uchyceny na vnitřní jaderné membráně, Lamin A se obvykle získává z formy zvané pre – Lamin A (který obsahuje navíc 18 terminálních aminokyselin), vzniklému Laminu A těchto 18 terminálních aminokyselin chybí (Beck et al., 1990; Sinensky et al., 1994; Kilic et al., 1997). Ztráta isoprenylovaného cysteinového zbytku ve zralém Laminu A zodpovídá za jeho rozpustnost během mitózy, jelikož není schopen udržet asociace s membránami, jakmile je lamin disociován (Bergo et al., 2002; Pendas et al., 2002).

Zatímco farnesylace a methylace Laminu typu B a pre – Laminu A jsou zřejmě nutné pro jejich správnou integraci na INM, jsou nutné i další interakce s IMP (inner membrane proteins, proteiny vnitřní jaderné membrány) pro integraci laminových filament. Bylo

dokázáno, že protein asociovaný s laminy LAP2 $\beta$  (lamin – associated polypeptide) specificky interaguje s tyčovou doménou Laminu B *in vitro* (Furukawa and Kondo, 1998). Kromě toho, injekce vazebného fragmentu LAP2 $\beta$  do živých buněk inhibuje jak integraci laminů, tak růst jaderné membrány (Yang et al., 1997). Proto se zdá, že LAP2 $\beta$  je nutný pro integraci Laminu B do jaderné membrány.

### **3.1.2. Funkční vlastnosti laminů**

Jako významné strukturální proteiny vnitřní jaderné membrány mají laminy důležité upevňovací funkce pro transmembránové proteiny (NETs). Lamin / NET komplexy jsou důležité pro organizaci periferního chromatinu. Laminy mají také důležité funkce v polohování NPC v rámci jaderné membrány, mají tedy také klíčovou roli v organizaci cytoskeletu. Jelikož se zdá, že laminy mají ústřední funkci v organizaci více různých architektonických prvků v buňce, všeobecně se předpokládá, že laminy jsou nosnou konstrukcí, která poskytuje odolnost a schopnost odolávat silám deformace v buňkách, které nemají buněčnou stěnu (Broers et al., 2004).

#### **3.1.2.1. Udržování jaderné integrity**

Sítě intermediálních filament nacházející se buď v cytoplazmě, nebo v jádře, mají zásadní roli v udržování buněčné a tkáňové integrity. Například mikroinjekcím mimetického peptidu, jehož sekvence je odvozena od sekce 1A centrální tyčové domény laminů, specificky narušuje vimentinovou síť intermediálních filament a vede ke ztrátě integrity cytoskeletu a zaobluje ploché buňky (Goldman et al., 1996). Mechanická stabilizační funkce intermediálních filament se odráží v jejich fyzikálních vlastnostech *in vitro*. Jestliže jsou intermediální filamenta vystavena napětí, jsou schopna odolávat mnohem větší deformaci bez poškození, než ostatní hlavní komponenty cytoskeletu, jako jsou mikrofilamenta a mikrotubuly (Janmey, 1998).

Pokud jsou jádra sestavována ve vaječném extraktu drápatky vodní, z nichž většina je imunodeficientních, výsledná jádra jsou malá a křehká (Newport, 1990). Dále byla provedena podobná studie, kdy byla jádra sestavována za přítomnosti dominantního negativního laminového mutanta. Tento mutant naruší laminovou polymerizaci, což vede k formování nepravidelného tvaru jádra. Podobné výsledky se ukazují po injikování mutantního laminového genu do savčích buněk. Tímto mutantním laminem narušená, imunodeficientní

jádra, jaderná membrána a jaderné póry se jeví jako běžně formující, ale membrána je náchylná k prasknutí během centrifugace nebo během mechanického stresu (Spann et al., 1997).

### **3.1.2.2. Interakce s chromatinem**

Fluorescenční mikroskopické studie potvrdily přítomnost jak A, tak B laminů v jaderném interiéru, projevující se jako laminové invaginace, které jsou pozorovatelné po celém interiéru jádra (Malhas and Vaux, 2011). V MEFs (myší embryonální fibroblasty) se Laminy typu B často spojují s klastry centromerického heterochromatinu, které se nazývají chromocentra. Jaderné kanály pronikají jaderným interiérem a tvoří velmi dlouhé výběžky, délka kanálu je přibližně 30 % poloměru jádra. V nedávné studii bylo pozorováno, že invaginace pozitivní na Laminy A se vážou na ložiska HP1b značených GFP. HP1b je isoforma Heterochromatinového proteinu 1, který se váže N – terminálním koncem k methylovaným histonům a C – terminálním koncem k Laminu A (Sehnalova et al., 2014). Dále byla imunologicky detekována invaginace pozitivní na Lamin A za využití specifických protilátek. Zajímavé bylo zjištění, že jaderné regiony s vysokou koncentrací Laminu A mají nízkou koncentraci Laminu B a naopak. Tato analýza rovněž potvrdila některé vlastnosti specifické pro regiony s vysokým obsahem Laminu A. Mezi tyto vlastnosti se řadí skutečnost, že laminové kanály obklopují chromatinová centra. Dále že se laminové kanály asociují s jadérkem. Ložiska HP1b a kanály Laminu A byly pozorovány jak na jaderné periferii, tak v interiéru jádra. V této studii byla také dokázána asociace laminů s kompartmenty jadérka, což bylo již dříve dokázáno pro Lamin B1 McNamara et al. (2012). Kanály Laminu A / C byly často pozorovány v úzkém kontaktu s regiony jadérka pozitivními na Fibrillarin (Legartova et al., 2014).

### **3.1.2.3. Interakce s transmembránovými proteiny**

Hlístice háďátka obecně poskytuje důležitý modelový systém pro pochopení podstaty proteinových komplexů, které jsou organizovány kolem laminů. Háďátko se jako model využívá díky své jednoduchosti. Obecně platí, že proto, že savčí buňky exprimují mnohem více laminů a NETs, existují významné rozdíly ve způsobu sestavování proteinových komplexů na jadernou membránu pomocí laminů. U háďátka dochází k expresi jen jednoho typu laminu, takzvaného Ce – Laminu, a tato exprese může být snadno potlačena pomocí RNA interference (RNAi) (Liu et al., 2000). Potlačení exprese Ce – laminu pomocí RNAi je

obecně doprovázeno embryonální smrtí. Vyřazení Ce – laminu způsobuje jaderné morfologické a mitotické vady (Liu et al., 2000) a dochází ke ztrátě lokalizace komplexů Ce – Emerin a Ce – MAN1 v ER. Emerin a MAN1 jsou integrální membránové proteiny, které se ve vazbě na lamin podílejí na segregaci chromosomů a dělení buňky, zatímco nepřítomnost Emerinu není pro buňku letální, pravděpodobně z důvodu částečného překrývání funkcí těchto dvou proteinů, MAN1 může funkce Emerinu převzít a je nepostradatelný. Jedním z dalších komplexů proteinů, který není vůbec, nebo jen krátce lokalizován v jaderné membráně následkem potlačením exprese Ce – laminu, je BAF komplex. BAF komplex v savčích buňkách reguluje genovou expresi modifikací chromatinové struktury (Liu et al., 2001). Zajímavé je, že potlačení tvorby Ce – MAN1 a Ce – Emerin díky RNAi také vede k selhání lokalizace BAF v jaderné membráně. Potlačení exprese Ce – Laminu, Ce-MAN1 / Emerinu, nebo Ce – BAF pomocí RNAi vede ve všech případech k identické tvorbě letálního mitotického fenotypu, včetně tvorby anafazických chromatinových mostů a aneuploidie. Tato zjištění naznačují, že Ce – Lamin je ústřední součástí komplexů Ce – MAN1, Ce – Emerin a Ce – BAF, které jsou nezbytné pro správnou segregaci chromatinu během mitózy (Liu et al., 2000; Zheng et al., 2000; Liu et al., 2001).

U obratlovců byla laminová asociace s NETs zkoumána za použití buněk nesyntetizujících Laminy A / C získaných z myši, pomocí RNAi nebo pomocí dominantních negativních mutantů, kteří narušují laminová filamenta. Při použití těchto postupů bylo zřejmé, že existují různé typy Lamin A – NET komplexů a Lamin B – NET komplexů, i když se mohou překrývat. Ukázalo se, že Laminy typu A se vážou na Emerin *in vitro*, vazebné místo pro Emerin bylo mapováno na sekvenci ocasové domény, která je společná pro Lamin A a Lamin C (Clements et al., 2000, Sakaki et al., 2001). Podobně u Lamin A / C vazebné místo pro Emerin bylo mapováno na sekvenci v polovině jeho ocasové domény (Lee et al., 2001). V nepřítomnosti Laminů A / C, nebo po odstranění Laminů A / C z jaderné vrstvy do nukleoplazmatických agregátů v přítomnosti dominantních negativních mutantů laminu, Emerin ztrácí lokalizaci na ER (Sullivan et al., 1999; Vaughan et al., 2001; Muchir et al., 2003). Zajímavé je, že absence Laminu typu A v jaderné vrstvě nevede ke ztrátě lokalizace LAP2 $\beta$  na ER (Vaughan et al., 2001), což naznačuje, že Emerin a LAP2 $\beta$  jsou upevněny do INM různými laminovými komplexy. Tento návrh je podporován zjištěním, že LAP2 $\beta$  se váže k Laminu typu B *in vitro* (Furukawa and Kondo, 1998) a dominantní mutant Laminu B1, který narušuje filamenta Laminu B, zapříčiňuje ztrátu lokalizace LAP2 $\beta$ . LAPs jsou proteiny

asociované s laminem, nacházející se v nukleoplazmě a pro přežití buňky jsou nepostradatelné (Schirmer et al., 2001).

Zatímco Emerin a LAP2 $\beta$  existují v odlišných laminových komplexech, oba proteiny se váží na BAF prostřednictvím svých LEM domén (doména totožná pro LAP2, Emerin a MAN1) (Furukawa, 1999; Lee et al., 2001; Shumaker et al., 2001), stejně jako MAN1 (Mansharamani and Wilson, 2005). BAF je lokalizován na INM v savčích buňkách, i když analýzy naznačují, že je poměrně mobilní. Důležité je, že BAF interaguje přímo s Emerinem na INM (Shimi et al., 2004). Exprese chybných mutací BAF v lidských buňkách inhibuje sestavení Emerinu, LAP2 $\beta$  a Laminu A ve znovu se formujících jádrech. V souladu s tímto zjištěním se usuzuje, že emerinové proteiny, které obsahují mutace v rámci domény LEM, nejsou integrovány jadernou membránou po mitóze (Haraguchi et al., 2001). Podobně peptidy, které obsahují doménu pro LEM LAP2 $\beta$ , inhibují sestavení laminů. Nicméně se zdá, že v savčích buňkách existují dva různé komplexy na INM, které obsahují BAF. Jeden obsahující Emerin a MAN1, který je upoután na Lamin A, a druhý obsahující LAP2 $\beta$  který je upoután na Laminu B (Gant et al., 1999).

#### **3.1.2.4. Organizace jaderných pórů (NPCs)**

Druhým důležitým fenotypem spojeným s RNAi knockoutem Ce – Laminu je shlukování NPC v rámci ER (Liu et al., 2000). Tento fenotyp je totožný jako ve studii zabývající se disrupcí Laminu Dm0 v octomilce obecné (Lenz-Bohme et al., 1997), což naznačuje, že jaderné laminy upevňují NPC v rámci jaderné membrány a udržují normální distribuce. U spermií drápatky vodní bylo zjištěno, že doména Laminu B interaguje s COOH – terminální doménou Nukleoporinu Nup153 (Smythe et al., 2000). Protein Nup153 je součástí jaderných pórů a podílí se na transportu částic. Nachází se v takzvaném nukleoplazmatickém kruhu NPC, odkud je schopný komunikovat s laminovými filamenty (Walther et al., 2001). Kromě toho, narušení laminových filament dominantními negativními laminovými mutanty, způsobuje selektivní ztrátu Nup153 (ale ne jiných nukleoporinů) z NPC, což naznačuje, že jsou potřebná laminová filamenta k udržování Nup153 v nukleoplazmatickém kruhu (Smythe et al., 2000). Eliminace Nup153 nebrání integraci laminových filament, ale vede k migraci a seskupování NPC v rámci jaderné membrány (Walther et al., 2001). Na základě těchto zjištění bylo navrženo, že jaderná vrstva laminů interaguje s nukleoplazmatickým kruhem NPC přes Nup153, a tím upevňuje NPC na jaderné membráně (Hutchison, 2001). Později byl objeven

jiný protein NPC, nazývaný Nup53, u kterého bylo prokázáno, že se váže přímo na Lamin B a upevňuje NPC subkomplex obsahující Nup93, Nup155 a Nup205 v jaderné membráně (Hawryluk – Garaet al., 2005). V nedávné studii byla také potvrzena vazba mezi proteinem jaderných pórů Nup88 a Láminem A. Tento protein se specificky váže na ocasovou doménu Laminu A, ale neváže se na Lamin B, eliminací této vazby docházelo u much octomilek obecných v tvorbě laminopatií (Lussi et al., 2011).

### **3.1.2.5. Organizace cytoskeletu**

Hád'átko obecné bylo také poprvé využito ke zjištění role laminových komplexů v organizaci cytoskeletu. Na vnitřní a vnější jaderné membráně byly lokalizovány 3 proteiny řadící se do SUN proteinové domény. Tyto proteiny se nazývají UNC – 83, UNC – 84, a Matefin / SUN1 (Malone et al., 1999; Starr et al., 2001; Lee et al., 2002; Malone et al., 2003). Zmíněné domény ukotvují Nesprin k jaderné membráně a podílejí se na upevnění jaderné membrány k cytoskeletu. UNC – 84 a Matefin / SUN1 jsou laminové vazebné proteiny, jejichž lokalizace na INM je závislá na Ce – laminu. UNC-83 bylo lokalizováno na ONM vazbou na UNC – 84 v lumen jaderné membrány (Gruenbaum et al., 2005).

Dále jsou k vnější jaderné membráně díky Matefin / SUN1 nebo UNC – 84 upevněny dva další proteiny. ZYG – 12 je mikrotubulární vazebný protein, který je upevněn na ONM pomocí Matefin / SUN1 (Walenta et al., 2001; Malone et al., 2003). ANC – 1 je homolog hád'átka k Nesprinu – 1 a je upevněn na ONM pomocí UNC – 84, kde interaguje s aktinovým cytoskeletem (Starr et al., 2001). Pomocí navázání UNC – 84 k INM udržuje Ce – lamin dva nezávislé proteinové komplexy na ONM, které propojí jadernou membránu buď s mikrotubuly a MTOC, nebo s Aktinem. Odstranění Ce – laminu, UNC – 84 / matefin (komplex homologní k savčím komplexům SUN domén) nebo ZYG – 12 (homologní k savčímu mikrotubulárnímu vazebnému proteinu) komplexů vede k narušení migrace centrosomu na jedné straně, což se projevuje tím, že dochází k mitotickému selhání fenotypu (Malone et al., 2003).

Odstranění Ce – Laminu, UNC – 84 nebo 1 – ANC komplexů vede ke ztrátě kontaktu s aktinovým cytoskeletem a tato ztráta se projevuje poruchou jaderného polohování (positioning) a migrace. Existují důkazy, že také v savčích buňkách laminy upevňují proteinové komplexy jaderné membrány, které interagují s cytoskeletem (Starr and Han, 2002).

## A. Vazba na Nesprin

Nukleární vrstva laminů a cytoskelet tvoří ucelenou strukturu, která zaručuje řádnou mechanickou funkci buněk. Byla studována korelace mezi stavebním a migračním chováním ve fibroblastech s/bez Laminu typu A. Ukázalo se, že ztráta Laminu typu A způsobuje ztrátu Emerinu a Nesprinu – 3 z jaderného obalu, současně s narušením spojení mezi jádrem a cytoskeletem v LMNA - / - buňkách (Lamin A – deficientní). Funkční migrační testy *in vitro* v těchto buňkách odhalily zpožděné přeorientování jádra a organizačního centra mikrotubulů při migraci, jakož i ke ztrátě jaderného oscilačního otáčení. Tato pozorování ve fibroblastech, izolovaných z LMNA knockout myši, byla potvrzena v 3T3 buněčné linii se stabilním snížením LMNA exprese způsobeným RNAi (Houben et al., 2008).

Nesprin – 1 se váže k Laminu A a Emerinu *in vitro* (Mislow et al., 2002), působí také jako Aktin – vazebný protein *in vivo* a *in vitro*. Vazebná funkce Nesprinu – 1 vyplývá z jeho lokalizace na ONM (Padmakumar et al., 2004). Další funkcí Nesprinu – 1 je upevnění jader na postsynaptické membrány na nervosvalové ploténky (Apel et al., 2000). Nicméně protože se váže přímo na Lamin A a Emerin, mohl by být také přítomen na INM. Navíc lokalizace Nesprinu – 1 na INM je v souladu se zjištěním, že Nesprin – 1 se podílí na upevnění kotevního proteinu svalové kinázy A (mAKAP – muscle A – kinase anchoring protein) jaderné membrány kardiomyocytů (Pappas, 1956).

V případě Nesprinu – 2 byla také prokázána vazba na Laminu typu A a Emerin *in vitro*, jeho lokalizace v jaderné membráně je závislá na expresi Laminu A, nebo C (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005). Přítomnost Nesprinu – 2 v komplexech Laminu A / C se zdá být nezbytná pro lokalizaci Emerinu na INM, jelikož dominantní mutanti Nesprinu – 2 mohou způsobit chybnou lokalizaci Emerinu v ER (Libotte et al., 2005). Nedávná studie prokázala totéž i u Nesprinu – 3, ve fibroblastech postrádajících Lamin A došlo ke ztrátě lokalizace Emerinu a Nesprinu – 3, současně se ztrátou spojení mezi jádrem a cytoskeletem (Houben et al., 2009).

Nesprin – 1 a Nesprin – 2 by také měli být upevněny do komplexů, které nezahrnují Laminu typu A. Oba proteiny interagují se savčími homology SUN1 prostřednictvím COOH – koncových zbytků. Navíc, malé interferující (si) RNA výrazně snižují expresi SUN1 nebo dominantních negativních SUN1 mutantů, obojí vede k chybné lokalizaci Nesprinu – 2 v ER. Lokalizace SUN1 na INM není závislá na typu laminu, což naznačuje existenci odlišných



Lamin – Nesprin a SUN1 – Nesprin komplexů (Padmakumar et al., 2005). Existence Nesprin – SUN1 komplexů byla potvrzena a výzkum prokazuje, že SUN2 se také podílí na tvorbě transnukleárních membránových komplexů (Crisp et al., 2006).

### **B. Vazba na mikrotubuly**

Cytosol, aktinové polymery, intermediální filamenta a mikrotubuly se mohou upevnit na povrchové buněčné adheze, být vzájemně propojeny a tvořit složité sítě. Tento cytoskelet je upevněn do jádra přes LINC komplexy (links the nucleoskeleton and cytoskeleton), které překrývají jadernou membránu a následně upevňují sítě filament do jádra. Nukleoskelet zahrnuje jaderné póry spojené s filamenty, Lamin A a B intermediální filamenta, síť jaderného mitotického aparátu (NUMA- nuclear mitotic apparatus), spektriny, Titin, polymery Aktinu a nejméně deset různých myosinových a kinesinových motorů. Tyto prvky představují "sít' sítí", která dynamicky reorganizuje během mitózy a je zodpovědná za organizaci a integritu genomu (Simon and Wilson, 2011).

Zatímco v háďátku obecném se vazby laminů na mikrotubuly a MTOC (mikrotubule – organizing centre, organizační centra mikrotubulů) zdají být zprostředkované prostřednictvím UNC – 84 a UNC – 83 (homology SUN), v savčích buňkách bylo dokázáno spojení mezi ztrátou kontaktu jádra s cytoskeletem a absencí Laminů A v jádře. Přímé fyzické spojení laminů na mikrotubuly v savčích buňkách je třeba teprve stanovit. U octomilky obecné již bylo připojení laminů na mikrotubuly prokázáno (Patterson et al., 2004; Houben et al., 2009). Buňky exprimující mutantní lamin ztrácí toto spojení, jelikož standardní jaderné migrace v disku očí octomilek jsou potlačeny, zároveň dojde v těchto buňkách k odpojení MTOC od jádra (Patterson et al., 2004). Předpokládá se, že v savčích buňkách dochází k připojení laminů na mikrotubuly přes SUN1 a proteiny ONM (Gruenbaum et al., 2005).

### **C. Vazba na intermediální filamenta**

Elektronové mikroskopické studie prokázaly přímou souvislost mezi NPC a cytoplazmatickými filamenty (Kiseleva et al., 2003), které jsou pravděpodobně intermediálními filamenty (Stoffler et al., 2003). Kromě toho, biochemické studie naznačují fyzické připojení proteinů cytoplazmatických intermediálních filament k laminům přes NPC (Bloom et al., 1996; Tolstonog et al., 2002). Vazba Desminu (protein, tvořící stavební podjednotku intermediálních filament III., nejčastěji u svalových buněk) na NPC se jeví jako

prostředek pro vazbu sarkomery na chromatin pomocí laminů, jestliže jsou pak srdeční myocyty natažené, lze pozorovat změny v prostorovém uspořádání, a to jak v síti Desmin – Lamin intermediálních filament, tak na chromatinu asociovaném na jaderné membráně. Protaháním vyvolané změny v chromatinu, zprostředkované spojením intermediálních filament a laminu, mohou být mechanismem pro aktivaci genů spojených s hypertrofií (Bloom et al., 1996). Další důkaz vazby Lamin-Desmin přišel ze studií LMNA - / - srdečních buněk, zobrazujících neorganizované sarkomery a absenci Desminu v NPC komplexech (Nikolova et al., 2004). Také další členové rodiny proteinů intermediálních filament III. se zdají být ovlivněni absencí Laminu typu A. LMNA - / - fibroblasty ukazují dezorganizaci vimentinové sítě (protein, který je hlavní složkou intermediálních filament III. mezenchymálních buněk) (Broers et al., 2004; Satteli and Li, 2011). Další studie prokázala, že kromě spojení intermediálních filament s NPC proteiny se cytoplazmatická intermediální filamenta váží na protein Nesprin – 3 přes plektinové proteiny (velké strukturální proteiny, které se vážou na intermediální filamenta) (Liu et al., 1996; Wilhelmsen et al., 2005).

### **3.1.2.6. Regulace genové exprese**

Laminy mají významnou funkci při replikaci a transkripci DNA. Je však důležité poznamenat, že vzhledem ke komplexní povaze těchto procesů, jejich přesná úloha je stále ještě poněkud nejasná. Funkční studie jsou většinou prováděny v umělých modelech, zahrnujících rozpad laminových molekul, celé laminové jaderné vrstvy, nebo celé jaderné membrány ve velkém měřítku. Výsledkem je, že změny v buněčných funkcích, připisované modifikacím laminů, mohou být sekundárními účinky vyplývajícími z daného postupu. Některé navržené funkce při transkripci nastávají v INM a zahrnují tvorbu represorových komplexů. Další funkce se vyskytují v rámci nukleoplazmy a naznačují, že laminy, zejména Laminy typu A, jsou lokalizovány v jaderných doménách, ve kterých interagují s vazebnými partnery, které nejsou integrálními membránovými proteiny. Ukazuje se, že Laminy typu A hrají také významnou roli při regulaci diferenciaci dospělých kmenových buněk, a že tyto role selhávají při mutacích laminu (Broers et al., 2005).

#### **A. replikace DNA**

Jaderné laminy jsou důležité pro průběh replikace DNA v průběhu S-fáze. První studie, které dokazují, že Lamin B se podílí na replikaci DNA, vznikly za využití bezbuněčného extraktu z vajíček drápatky vodní, který podporuje shlukování kompetentních jader

schopných replikace *in vitro*, většina laminů v tomto extraktu byla imunodeficientní (Newport et al., 1990; Meier et al., 1991). Fyzické nebo funkční vyčerpání endogenního Laminu B z těchto extraktů, za použití protilátek, vyústí v sestavení jader, která mají křehké jaderné membrány a funkční NPC, která však postrádají laminy a nejsou schopna replikovat DNA, přestože jaderná membrána se jeví schopná transportovat proteiny fyziologicky (Newport et al., 1990; Meier et al., 1991; Jenkins et al., 1993). V tomto modelu je vyžadováno sestavení laminů pro stabilizaci a udržení bariérové funkce jaderného obalu tak, že replikační faktory (jako DNA polymeráza a PCNA) mohou být koncentrovány v jádru (Walter et al., 1998). Tento závěr je založen na výsledcích získaných z vysoce koncentrovaných jaderných extraktů pocházejících z replikujících jader Drápatky. Tento extrakt byl použit na podporu semikonzervativní replikace na chromatinových templátech za nepřítomnosti jaderné membrány a bez sestavení detekovatelných laminových struktur (Spann et al., 1997).

Lamin B1 byl také pozorován v kultivovaných buňkách k lokalizaci center replikace DNA během S fáze (Moir et al., 1994; Philimonenko et al., 2006). Proto se zdá, že Laminy typu B mohou mít důležitou úlohu při syntéze DNA. Mechanismus, kterým laminy ovlivňují replikaci DNA je však diskutabilní. Dominantní negativní mutanti Laminu B postrádající sekvence ocasové domény, které jsou použity buď k inhibici sestavování laminů nebo rozrušují laminy plně sestaveného, replikujícího se jádra. Při použití tohoto přístupu, jedna studie uvedla, že Laminy typu B se hromadí jako nukleoplazmatické agregáty, které asociují proteiny zapojené do elongační fáze replikace DNA, což vede k domněnce, že laminy se podílejí na elongační fázi replikace DNA (Spann et al., 1997; Moir et al., 2000). Naproti tomu dvě další studie uvádějí, že zabránění procesu sestavování laminů inhibuje iniciační fázi replikace DNA. Zatímco narušení laminů v jádrech, která již zahájila iniciaci replikace DNA, neinhibuje rozběhlou syntézu, což znamená, že laminy jsou nutné pro iniciaci, ale ne pro elongační fázi replikace DNA (Ellis et al., 1997; Izumi et al., 2000). Kromě toho tyto studie ukazují, že vychytávání proteinů zapojených do elongační fáze replikace DNA do nukleoplazmatických laminových agregátů neinterferuje s replikačními komplexy (Izumi et al., 2000). Komplexy LAP2 $\beta$  a HA95 se také ukázaly jako potřebné pro iniciaci, ale ne elongační fázi replikace DNA. Zdá se, že tento komplex zabraňuje zaměření iniciačního proteinu cdc6 (cell division control protein 6). Proto jedno vysvětlení pro roli Laminu typu B v iniciaci replikace DNA je, že nabírá LAP2 $\beta$  / HA95 komplex na INM a tím stabilizuje cdc6 (Martins et al., 2003).

Dále bylo zjištěno, že dva faktory nezbytné pro elongační fázi replikace, PCNA a RFC (replikační faktor C), se nacházejí v agregátech s laminovými proteiny (Ellis et al., 1997).

V nedávné studii byla také pozorována asociace mezi Laminy A a replikačními ložisky pozitivními na BrdU (Bromodeoxyuridin – syntetický nukleosid analogní k thymidinu). BrdU slouží jako marker syntézy DNA. Interní laminové kanály nebyly kolokalizovány s BrdU pozitivními replikačními ložisky, ale blízká asociace byla pozorována mezi Laminem A / C a BrdU pozitivními replikačními ložisky na periférii jádra. Toto zjištění koreluje s tím, že jaderná periferie reprezentuje důležitý region pro vazbu heterochromatinu (Legartova et al., 2014).

## **B. transkripce**

Jak Laminy typu A, tak Laminy typu B mají významné funkce v regulaci transkripce. V embryonálních i somatických buňkách se mohou Laminy B vázat na RNA polymerázu II a narušení laminů s použitím dominantních negativních mutantů inhibuje aktivitu této polymerázy II (Spann et al., 2002). Z tohoto zjištění vyplývá, že laminy jsou zapojeny v základním procesu syntézy RNA. Na rozdíl od Laminů B, Laminy A ovlivňují aktivitu proteinů, které regulují transkripci. Bylo pozorováno, že se Laminy typu A váží na různé transkripční regulátory:

- protein MOK2 (Dreuillet et al., 2002) – zinc finger protein
- vazebný protein SREBP1 (Lloyd et al., 2002) - Sterol regulatory element – binding transcription factor 1
- protein retinoblastomu (Rb), (Ozaki et al., 1994)
- přímá interakce s c-Fos (Ivorra et al., 2006) – transkripční faktor (cellular proto-oncogenic transcription factor)

Rb funguje tak, že potlačuje aktivitu komplexu E2F – DP3 transkripčního faktoru, který je nutný pro aktivaci exprese genů potřebných pro vstup do S – fáze buněčného cyklu (Korenjak and Brehm, 2005). Rb figuruje jako transkripční represor a koreluje s tím, že je upoután na struktury v jádru a delecí v jeho COOH – konci se zabrání nukleární vazbě (Mittnacht and Weinberg, 1991). Vázaný Rb je lokalizován na nukleoskeletu vláken, která mají rozměry jako intermediální filamenta (Mancini et al., 1994). Nejméně dvě linie důkazů dosvědčují, že tato

filamenta obsahují Laminy typu A (Dechat et al., 2000; Markiewicz et al., 2002; Johnson et al., 2004).

Také byla objevena přímá interakce mezi Laminy A / C a c – Fos. Interakce Laminu A s c – Fos má za následek potlačení aktivačního proteinu AP – 1 a snížení proliferace myších embryonálních fibroblastů. Nedávno bylo také zjištěno propojení mezi Laminy A / C a transkripčními místy značenými FIU – pozitivním signálem (Legartova et al., 2014).

Ačkoliv laminy samy o sobě působí jako transkripční faktory, existuje stále více důkazů, že jejich interakce s několika transkripčními regulačními proteiny může vysvětlit vznik různých nemocí spojených s laminy.

### **3.1.3. Dynamika laminů během interfáze somatických buněk**

Zatímco nejčastější lokalizace laminů během interfáze je v jaderném obvodu, stále větší počet studií uvádí, že v interfázních buňkách lze nalézt laminy v nukleoplazmatických oblastech. Na základě těchto poznatků lze rozlišit tři úrovně organizace laminů:

- 1) laminy spojené s jadernou membránou
- 2) laminy uspořádané do intranukleárních ložisek
- 3) laminy viditelné jako dispergované v nukleoplazmě (Broers et al., 2005)

#### **3.1.3.1. Dynamika laminů integrovaných do jaderné membrány**

Nejvýznamnější koncentrace laminů je viditelná na vnitřní straně jaderné membrány, kde se laminy shromažďují do sítoviny laminových proteinů, nazvaných nukleární vrstva. Za použití fluorescenčních bělicích technik Lamin – GFP transferovaných buněk bylo potvrzeno, že většina laminových proteinů, které jsou organizovány do nukleární vrstvy, vykazuje velmi nízký pohyb. Oba, jak Lamin A – GFP, tak Lamin B1 – GFP jsou v nukleární vrstvě téměř zcela nepohyblivé, jak bylo odvozeno z nedostatku aktivity po odbarvování v průběhu několika hodin pro Lamin A a dokonce v rámci 45 hodin, pro Lamin B1 (Broers et al., 1999; Daigle et al., 2001). Nicméně poté, co byl pozorován touto metodou Lamin C – GFP, bylo zjištěno značné snížení fluorescenčního signálu v laminech mimo bělených regionů, což naznačuje, že Lamin C je mobilnější, než Laminy A nebo B1 (Broers and Ramaekers, 2004) a potvrzuje tak předchozí biochemické studie (Gerace and Blobel, 1982; Dagenais et al., 1990).

Funkční důsledky pro dynamické chování Laminu C v jaderné vrstvě nejsou jasné. Lamin C může působit jako prostředek pro upevnění různých oblastí heterochromatinu na jaderné membrány i k inaktivaci genové exprese. Případně může Lamin C tvořit kyvadlovitou strukturu mezi nukleární vrstvou a nukleoplazmatickými laminy v reakci na replikaci a / nebo regulaci transkripce (Broers and Ramaekers, 2004).

### **3.1.3.2. Dynamika laminů v intranukleárních ložiscích**

Existuje stále více důkazů, že intranukleární ložiska laminů jsou nativní laminové struktury, které mohou být spojené se zahájením replikace (Spann et al., 1997; Dimitrova and Berezney, 2002), nebo s transkripčními komplexy (Jagatheesan et al., 1999).

Ve studii využívající mikroinjekce biotinylovaného lidského Laminu A do cytoplazmy myších 3T3 buněk byl protein rychle transportován do jádra, kde se v prostoru nukleoplazmy zformovala samostatná ložiska, která se následně začlenila do endogenní laminové vrstvy po dobu několika hodin. Tyto údaje naznačují, že laminové subjednotky mohou vstoupit do polymerizované laminové sítě během interfáze. Podobná ložiska byla pozorována v buňkách za použití laminových protilátek, zejména v průběhu G1 fáze, což naznačuje, že tyto nukleoplazmatické struktury nejsou pouze pozůstatky, které se nahromadily kvůli přebytku laminových proteinů (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993). Také byla provedena analýza buněčného cyklu distribuce Laminu A a C v lidských dermálních fibroblastech a byla objevena laminová ložiska a vláknité provazcovité struktury uvnitř jádra, také nejvíce nápadné v G1 fázi. Barvení lipofilním barvivem indikuje, že nejsou asociované s invaginacemi jaderné membrány. Nukleoplazmatické akumulace laminů byly zaznamenány v buňkách transferovaných wild-type a mutantním genem laminu. Laminové provazce v těchto buňkách se spojují s regiony obsahujícími heterochromatin (Holtz et al., 1989; Horton et al., 1992; Lutz et al., 1992; Martelli et al., 1992).

Moir et al. (1994) ukázali, že zejména Lamin B je spojen s ložisky replikace DNA v S – fázi buněk. Následné studie popsaly, že Laminy A jsou přítomny v ohniscích replikace DNA obklopující jádérko, které obsahují replikační proteiny, jako jsou P150 a PCNA (Kennedy et al., 2000). Tato ložiska jsou založena v rané G1 fázi a také zahrnují členy rodiny pRB (retinoblastomový protein). Později, v S – fázi, jsou ložiska replikace DNA rozmístěna do regionů po celém jádře. Studie mutantních laminů naznačují, že fyziologické shromažďování

laminů vyžaduje založení replikačních center DNA (Ellis et al., 1997), a že laminy jsou důležité pro elongační fázi syntézy DNA (Spann et al., 1997).

Kromě asociace laminů s replikačními ložisky, existuje další výzkum o koncentraci laminů v jaderné oblasti se zvýšenou aktivitou RNA polymerázy II, ukazující na transkripci (Spann et al., 2002). Tito autoři ukazují, že narušení normální laminové organizace inhibuje aktivitu RNA polymerázy II, což naznačuje, že laminy jsou zapojeny do syntézy RNA tím, že působí jako lešení, na kterém jsou organizovány transkripční faktory potřebné pro aktivaci RNA polymerázy II. Jagatheesan et al. (1999) a Muralikrishna et al. (2001) ukázali potenciální úlohu Laminu A v procesu sestřihu RNA. Našli přítomnost intranukleárních ohnisek Laminu A, které se sdružují s místy RNA sestřihu v C2C12 myoblastů a myotubulů. Laminová ložiska byla pozorována u dělicích myoblastů, ale zmizela brzy během diferenciaci v postmitotických myocytech, a nebyla přítomna v myotubulech a svalových vláknech. Tyto výsledky naznačují, že diferenciaci svalových buněk je doprovázena regulovanými přestavbami v organizaci Laminu A (Jagatheesan et al., 1999, Muralikrishna et al., 2001). Novější práce se věnují otázkám zásadní role Laminů A/C v sestřihu, jelikož myši LMNA - / - buňky se zdají být schopny udržet plně funkční kompartmenty faktorů sestřihu. Ve skutečnosti mohou být detekována specifická intranukleární ložiska pouze pomocí jedné konkrétní monoklonální protilátky a ta by mohla prezentovat něco jiného, než struktury obsahující lamin (Vecerova et al., 2004).

Je pravděpodobné, že alespoň některá z intranukleárních laminových ložisek, viditelných s využitím imunofluorescence, jsou podobná intranukleárním a transnukleárním kanálům, pozorovaných po mikroinjekci (Fricker et al., 1997) nebo po zobrazení GFP – lamin transfekovaných buněk (Broers et al., 1999). Tyto intranukleární kanály jsou viditelné po transfekci s GFP – Laminu A nebo s GFP – Lamin B1), ale také v normálních lidských fibroblastech, za použití běžných imunofluorescenčních technik. Počet intranukleárních kanálů je velmi variabilní, v rozmezí od nuly do desítek kanálů na buňku. Většina z těchto kanálků obsahuje membránové lipidy, jakož i komplexní proteiny jaderných pórů (Broers et al., 2004).

Laminy A, Laminy B, Emerin a proteiny komplexu nukleárních pórů mohou být v těchto kanálech přítomny, což naznačuje, že by tyto plně vyvinuté invaginace jaderné membrány mohly sloužit jako přepravní kanály mezi různými cytoplazmatickými oblastmi (Fricker et al.,

1997). Kromě toho bylo prokázáno, že cytoplazmatické aktinové proteiny jsou také přítomny v těchto strukturách (Johnson et al., 2003). Zobrazení v živých buňkách ukazuje, že tyto kanály mohou přetrvávat po delší dobu a zdá se, že jsou poměrně stabilní, ale pružné, podobně jako laminy přítomné v jaderné vrstvě, jak bylo viděno v trojrozměrném zobrazování. Další studie ukázaly, že fluorescenční kanály GFP – laminů jsou stabilní s velmi nízkým pohybem fluorescenčních molekul, podobně jako laminy v jaderné vrstvě (Broers et al., 1999). Johnson et al. (2003), naznačují, že počet kanálů se zvyšuje s dediferenciací. V umělých systémech při nadměrné expresi Laminů A, B1, B2 (ne Laminu C) dochází k růstu jaderné membrány, který je doprovázen jadernou asociací a zvýšením jaderných invaginací nebo takzvaných intranukleárních membránových sestav. Zdá se, že přítomnost (část) CAAX motivu v laminech je dostačující k vyvolání růstu jaderné membrány (Prufert et al., 2004). Prufert et al. (2004) uvádějí, že v modelu, který použili, byl pre-Lamin A pravděpodobně v surovém stavu (nezpracovaný), zatímco jiní mohli detekovat zvýšenou tvorbu intranukleárních kanálů po transfekci Laminem A – GFP, který byl prokázán jako plně zpracovaný (Broers et al., 1999). Podobně akumulace Progerinu, který je částečně zpracovaný mutovaným pre – Laminem A, způsobuje tvorbu intranukleárních membránových invaginací (McClintock et al., 2006).

### **3.1.3.3. Dynamika disperzních nukleoplazmatických laminů**

Výzkumy naznačují přítomnost disperzních intermediálních filament laminové sítě v celém jádru (Hozak et al., 1995; Jackson, 2004). Také Cdc14B (Cell division cycle 14B) Tyrosin-fosfatáza označená GFP ukazuje jadernou síť filament, která začíná na nukleolární periferii a rozšíří se na nukleární membránu a často tvoří úzké spojení s komplexy jaderných pórů (Nalepa and Harper, 2004). Existence disperzní sítě nukleoplazmatických laminů byla navržena po použití různých technik, které prokázaly, že značná část intranukleárních laminů, viditelných jako difuzní nukleoplazmatická fluorescence, je stabilně integrována do jaderného interiéru (Broers et al., 1999; Moir et al., 2000). Pozoruhodné je, že jsou pozorovány velké rozdíly v intercelulárním fluorescenčním zobrazení po transfekci Laminu C – GFP, který je výraznější než Lamin A – GFP transfekované buňky (Broers and Ramaekers, 2004). Interakce s jinými intranukleárními strukturami, včetně (dočasné) asociace chromatinu nebo vazba na jaderné histonové proteiny, známé pro své interakce s laminy *in vitro* (Taniura et al., 1995; Goldberg et al., 1999), se zdají být zřejmým vysvětlením tohoto jevu. Bylo navrženo, že laminy mohou polymerovat do intranukleárních intermediálních filament (Hozak et al., 1995), mohly



by tedy existovat alternativní sestavovací vzory. Úkol této sítě v buněčných procesech je nejasný. Předpokládá se, že tato nukleoplazmatická laminová filamenta poskytují oporu pro procesy, jako je transkripce a replikace DNA. Studie na buněčných liniích transfekovaných GFP – laminy, ve kterých se vyskytují mutace podobné jako u Emery – Dreifussovy svalové dystrofie a Dunniganovy lipodystrofie ukázaly, že tyto mutované laminy se řádně nezačleňují do nukleoplazmatické vrstvy. Tato zjištění podporují možný význam Laminů A ve fyziologickém fungování DNA (Broers et al., 2005).

### **3.1.4. Dynamika laminů během mitotického dělení somatických buněk**

#### **3.1.4.1. Rozpad jaderných laminů**

K nejdramatičtějším změnám v architektuře laminů dochází v průběhu procesu dělení buněk – při mitóze. Při přechodu z profáze do prometafáze buněčného dělení dochází k rozpadu jaderné membrány a také laminů. Bylo zjištěno, že na konci profáze se mikrotubuly váží na jadernou membránu přes Dynein a odtrhávají membránové fragmenty z jádra. V důsledku toho se jaderný obal stává částečně narušený, což umožňuje kinázám vstup do jádra a mohou fosforylovat laminové molekuly, které se následně rozpouštějí (Beaudouin et al., 2002).

Jelikož mechanismus desintegrace jaderné membrány pomocí mikrotubulů je zajímavý, existují další studie, které argumentují proti klíčové roli mikrotubulů při narušení membrány a vyvolání mitózy. **Za prvé**, v buňkách postrádajících Cdk1 jsou mikrotubuly a Dynein normálně přítomny, ale k rozdělení jaderného obalu nedochází (Laronne et al., 2003). **Za druhé**, mohou polymery Laminu B1, přítomné v interfázi, odolávat mnohem vyššímu napětí, než je síla, která může být vytvořena tahem mikrotubulů na jadernou membránu. Proto se zdá být kombinace fosforylace s tahem membrány namísto trhání pravděpodobnějším scénářem pro iniciaci mitózy. V savčích buňkách začíná disociace Laminů A / C jaderné vrstvy v rané profázi, zatímco Laminy B se oddělují teprve později (Georgatos et al., 1997). Laminy A se na počátku profáze rychle rozpouští a zcela rozptylují do cytoplazmy, zatímco částice Laminu B zůstávají na jaderné periférii až do prometafáze spojené s konstrukcí jaderné membrány (Gerace and Blobel, 1980; Nigg, 1992; Georgatos et al., 1997). Tento názor byl ale v rozporu s výzkumem, ve kterém pomocí Lamin B1 – GFP dokazují, že se Laminy B rozpouští na začátku mitózy (Daigle et al., 2001; Beaudouin et al., 2002). Avšak to, zda se nativní Laminy B oddělují od vesikulů jaderné membrány během mitózy, je třeba ještě prokázat. Pořadí

disociace jiných proteinů jaderné membrány, která je do značné míry závislá na disociaci laminů, je obtížné určit, vzhledem ke krátké době trvání této konkrétní fáze buněčného cyklu, a rozsáhlé změně epitopů proteinů vyplývající z fosforylace (Margalit et al., 2005).

Například rozpad laminů v průběhu mitózy vyžaduje 3 – 4 hodiny v jádrech jater potkanů, 1 – 2 hodiny v thymocytech potkanů a přibližně 20 minut v embryonálních jádrech drápatky (Newport and Forbes, 1987). Tyto doby by mohly být rozdílné díky odlišné specifické buněčné expresi laminových izoform (Rober et al., 1989). Jádra potkaních jater exprimují oba typy Laminů, jak A, tak B, zatímco thymocyty a embryotické buňky exprimují přednostně Lamin B (Gerace and Blobel, 1980; Krohne et al., 1984; Rober et al., 1989). Tyto různé časové intervaly laminové depolymerace jsou tedy pravděpodobně zapříčiněné různými buněčnými typy. Různé buněčné typy také vykazují různou tloušťku nukleární vrstvy laminů, což má za následek rozdílné časové intervaly depolymerace, díky většímu množství polymerů laminů, dále je interval ovlivněn expresí lamin asociovaných proteinů (LAPs) a sekundární modifikací laminů (Paddy et al., 1990; Belmont et al., 1993; Moir et al., 1995; Krohne, 1998).

Rozklad jaderných laminů je řízen fosforylací laminových podjednotek díky p34Cdc2 kináze (Cyklin – dependentní kináza 2 fosfoprotein), což způsobuje depolymerizaci laminových polymerů vyššího řádu za vzniku především monomerů, dimerů a tetramerů. Tato kináza zdá se přímo fosforyluje lamin na zbytcích, které lemují tyčovou doménu laminu a je významná pro iniciaci mitózy (Gerace and Blobel, 1980; Ottaviano and Gerace, 1985; Newport and Forbes, 1987; Peter et al., 1990; Heald and McKeon, 1990; Dessev et al., 1991). Opětovné sestavení laminů je v přímé korelaci s defosforylací těchto zbytků (Peter et al., 1990). Degradací proces laminů se zdá být postupný, což vede ke smršťování korespondujícím se zmenšováním jaderného průměru (Newport and Forbes, 1987; Dessev and Goldman, 1988).

#### **3.1.4.2. Opětovné složení laminů**

Na konci mitotického dělení buněk dochází k opětovnému znovusložení komponentů jaderné membrány kolem chromatinu a k opětovné tvorbě bariéry mezi jádrem a cytoplazmou (Gant and Wilson, 1997). Laminy komunikují s komponenty jaderného obalu a s chromatinem a tyto interakce jsou stěžejní pro správné sestavení jaderné membrány (Burke and Gerace, 1986). Opětovné složení laminů začíná již na konci anafáze sdružením LAP2 $\alpha$  a BAF s koncovými částmi chromozomů, doprovázené LBR (Lamin B receptor) a malými

frakcemi Emerinu (Yang et al., 1997; Haraguchi et al., 2000), následované LAP2 $\beta$  (Haraguchi et al., 2000; Dechat et al., 2004). Existují některé protichůdné údaje o zpětné reasociaci Laminů B, zejména Laminu B1. Studie s GFP – značeným lidským Laminem B1 v mitotických buňkách ukázaly, že tento lamin se začíná sdružovat s okrajovými oblastmi chromozomů během pozdní anafáze až do poloviny telofáze, což naznačuje, že je vyžadována polymerace Laminu B1 pro dekonduzaci chromatinu a vazbu prekurzorů jaderné membrány v průběhu raných fází opětovného složení jaderné membrány (Moir et al., 2000; Lopez – Soler et al., 2001). Bylo však také zjištěno, že akumulace Laminu B1 kolem chromatinu by mohla být detekována pouze v pozdní telofázi / začátku cytokineze, tedy ve fázi, kdy je již chromatin utěsněn membránou obsahující póry (Daigle et al., 2001; Broers and Ramaekers, 2004). Od telofáze se Lamin B1 znova spojuje s membránovými částicemi, které však dosud obklopují chromozomy. Toto znovusestavení Laminu B, které může být viditelné krátce po LAP2 $\beta$ , je pozorovatelné kolem chromatinu. Až v pozdní telofázi / cytokinezi se Lamin B1 – GFP znova začleňuje do struktury jaderné membrány (Dechat et al., 2004).

Zobrazování Laminu A – GFP v buňkách (Broers et al., 1999, Moir et al., 2000) ukázalo, že po metafázi dochází k opětovnému sestavení všech tří typů Laminu A (Lamin A, Lamin A $\Delta$ 10 a Lamin C) až po cytokinezi. Většina molekul všech tří typů Laminu A se nepohybuje směrem k nově se formujícímu jádru, dokud nedojde k dokončení cytokineze (Broers et al., 1999), kdy se většina Laminů A zdá být translokována prostřednictvím nově formované NPC (Chaudhary and Courvalin, 1993). V této fázi jsou Lamin A velmi rychle spojeny s chromatinem a jaderným obalem, jelikož již není viditelný v cytoplasmě žádný GFP signál obklopující chromozomy během 3 minut po zahájení lamin – GFP kondenzace. Zatímco zobrazovací studie distribuce GFP – laminu v živé buňce nemůže vyloučit, zda se subpopulace zejména molekul Laminu C koncentruje na části povrchu chromozomů v pozdní anafázi, je zřejmé, že většina molekul Laminu A se znova sestavuje až v průběhu a po skončení cytokineze. Jelikož zralý Lamin A a Lamin A $\Delta$ 10 (alternativně spojený produkt genu LMNA, který postrádá všechny zbytky exonu 10) ztrácí svou isoprenylovou skupinu po začlenění do jaderné membrány, opětovné znovusestavení těchto proteinů po konci mitózy, spolu s Laminem C, bude zahrnovat mechanismus, který je nezávislý na této isoprenylové skupině (Foisner, 1997; Yang et al., 1997; Dechat et al., 2004).

U drápatky vodní a octomilky obecné byly zjištěny dvě různé skupiny jaderných vesikul potřebných ke znovusestavení jaderné membrány. První populace se může vázat na

chromatin, ale vyžaduje fúzi s druhým, takzvaným fúzogenním typem vesikul, za tvorby dvojité jaderné membrány (Vigers and Lohka, 1991; Drummond et al., 1999). U drápatky jsou různé izoformy laminů spojeny s oběma typy těchto vesikul, zatímco u octomilky je jedna laminová izoforma spojena pouze s nefúzogenními vesikuly (Goldberg et al., 1998).

### **3.1.5. Dynamika laminů v oocytech v průběhu meiotického zrání**

Oocyty, nebo také samičí zárodečné buňky, mají velmi odlišnou architekturu od somatických buněk. Jsou to velké, vysoce specializované buňky obsahující zásoby všech buněčných komponentů, potřebných pro podporu rychlého časného embryonálního dělení v jejich cytoplazmě. Jádro oocytů pozastavených na začátku meiózy v profázi I (první meiotický blok), je velmi velké a je označováno jako zárodečný váček (GV, germinal vesicle). I když funkční relevance GV oocytů je jasná, může být také prostředkem k dlouhodobému ukládání spontánně složených složek jaderné membrány, jako jsou NPC a laminy (Goldberg et Allen, 1993; Ribbeck and Gorlich, 2001). Plně dorostlý savčí oocyt je transkripčně neaktivní a využívá pouze RNA transkripty syntetizované a uložené v průběhu časného vývoje. Tyto RNA transkripty přítomné v jádře obsahují i mRNA nezbytné pro meiotickou progresi. Před rozpadem jaderné membrány, tedy ve stádiu GV, jsou velké translační oblasti lokalizovány v perinukleární oblasti. V nedávné studii Šušor et al. (2015), zabývající se regulačními dráhami translace bylo zjištěno, že krátce po rozpadu jaderné membrány v průběhu prvního meiotického dělení, dochází k rozvoji dvou rozdílných translačních oblastí. První byla lokalizována v oblasti chromozomů (CTA – chromozomální translační oblast) a druhá v oblasti, která před rozpadem jaderné membrány obklopovala jádro (PTA – perispindulární translační oblast). Tyto odlišné oblasti byly od sebe oddělené asociovanými Laminy A / C a endoplazmatickým retikulem. Toto ohraničení bylo lokalizováno krátce po rozpadu jaderné membrány a mizelo v průběhu prometafáze I.

Meióza je vysoce specializovaný buněčný proces, nezbytný pro pohlavní rozmnožování. Diploidní zárodečné buňky musejí podstoupit meiózu, neboli také redukční dělení, aby mohly produkovat haploidní gamety. Haploidizace zahrnuje párování a rekombinaci homologních chromozomů jako předpoklad pro jejich řádné oddělení. Párování homologních chromozomů vyžaduje jejich aktivní přemístění v rámci meiotického jádra, které závisí na interakci telomer s jaderným obalem. Tato asociace je životně důležitá pro správný průběh meiózy a tedy zásadní pro plodnost (Lenart and Ellenberg, 2003). V nedávné studii bylo pomocí protetických a interakčních metod potvrzeno, že laminové struktury jaderného obalu

interagují s rekombinačním mediátorem BRCA2 a kohezním faktorem PDS5 pro zajištění trvalých rekombinačních míst v jaderném obalu a také společně s Kohesinem interagují laminy jaderné membrány s transkripčním represorem CTCF pro zajištění správného polohování genů v intranukleárních oblastech (Carlberg and Molnár, 2014). Data dokazují, že trvalé DNA zlomy mohou korespondovat s crossing overy, které jsou mobilizované do jaderné membrány (Kusch, 2014).

V jiné studii byla zkoumána úloha jaderných laminů strukturálního skeletu, který je úzce spojen s vnitřní částí jaderné membrány. V somatických buňkách jsou laminy klíčovým hráčem v organizaci chromatinu a plní různé funkce, jako je údržba jaderné struktury a regulace transkripce. Aby byla pochopena jejich role při meióze, byl ve studii použit Lamin C2, exprimovaný v samčích zárodečných buňkách. Jak se ukázalo, Lamin C2 je nezbytný pro včasné přemístění meiotických telomer. Při jeho absenci jsou synapse homologních chromozomů vážně ovlivněny. Tyto meiotické defekty vedou k neplodnosti u mužů. To též vede k závěru, že jaderné laminy přímo přispívají k plodnosti usnadněním meiotického pohybu chromozomů (Dernburg, 2013).

Ve studii Mori et al. (2014) využívající oocyty hvězdic (*Patiria miniata*) bylo zjištěno, že po znovuzahájení meiózy po meiotickém bloku dochází k rozpadu jaderné membrány (NEBD) jiným mechanismem, než je tomu u somatických buněk. Jelikož jádra oocytů jsou mnohonásobně větší, než většina jader somatických buněk, tubuliny, které při mitóze tahem dezintegrují jadernou membránu, by nedokázaly obsáhnout celou plochu jádra oocytu. V procesu meiotického zrání u oocytů hvězdice nejdříve dochází k rozpadu komplexů jaderných pórů a k formování aktinového obalu (Arp2/3 F – Aktin komplex) kolem jaderné membrány, se kterou asociuje a díky této asociaci následně dochází k fragmentaci jaderného obalu a také dochází k fragmentaci jaderných laminů. Nakonec dochází k depolymeraci jaderných laminů a rozpadu jaderné membrány. Aktinový obal zformovaný kolem jaderného obalu v profázi I je stěžejní nejen pro fragmentaci a následný rozpad jaderné membrány oocytů hvězdic, zásadně se podílí i na správném zachycení chromozomů do mikrotubulárního vřeténka (Mogessie and Schuh, 2013; Mori et al., 2014).

Zvyšování permeability a následný rozpad jaderné membrány je důsledkem hromadění MPF (maturation promoting factor) v jádře během časně profáze. Tato akumulace vede k jeho aktivaci. Aktivovaný MPF pak fosforyluje substráty během, nebo bezprostředně po vstupu do

jádra. Mezi substráty řadíme většinu nukleoplazmatických proteinů, jako jsou nukleoporiny, proteiny vnitřní jaderné membrány a laminy. Jejich fosforylací dochází k uvolnění z jaderné membrány (Hashimoto and Kishimoto, 1986; Ward and Kirschner, 1990; Ookata et al., 1992; Hagting et al., 1999; Iwashita et al., 1998; Hinchcliffe et al., 1999; Takizawa and Morgan, 2000). Je pravděpodobné, že permeabilizace začíná lokálním porušením membrány, které je způsobené úplným odstraněním NPC. Permeabilizace se poté šíří z původního místa ve vlně přes povrch jaderné membrány. Depolymerace laminů začíná až poté, co dochází ke smíchání obsahu jádra a cytoplazmy (Terasaki, 1994; Terasaki et al., 2001).

Po NEBD chromozomy pokračují do metafázní destičky meiózy I, poté rychle vstupují do anafáze a telofáze a je vyděleno první pólové tělísko. Chromozomy se rychle zarovnávají do druhého meiotického vřetenka a zde, ve stádiu metafáze II se u většiny obratlovců tvoří druhý meiotický blok a do anafáze II vstupují až po fertilizaci (Lenart and Ellenberg, 2003).

Během meiózy I a II jsou oocyty v M fázi, s významnou aktivitou MPF (Nebreda and Ferby, 2000; Karabinova et al., 2011). Proteiny jaderné membrány, jako jsou laminy a nukleoporiny jsou fosforylovány, aby nedocházelo k polymeraci laminů a zpětnému sestavení NPC. Zajímavé je, že i když aktivita MPF klesá mezi dvěma meiotickými děleními, nedochází ke zpětnému formování jaderné membrány kolem chromozomů. Prevence tvorby jaderné membrány je zřejmě důležitým předpokladem pro inhibici replikace DNA v redukčním dělení (Nakajo et al., 2000; Nebreda and Ferby, 2000).

V nedávné studii (Šušor et al., 2015) bylo však na myších modelech zjištěno, že po rozpadu jaderné membrány dochází v rané fázi meiotického zrání na rozdíl od mitózy k asociaci depolymerovaných laminových struktur a endoplazmatického retikulala a tyto struktury tvoří mechanické bariéry kolem chromatinu. Dochází k tvorbě kompartmentů, které oddělují chromatin a nukleoplazmu od zbytku buněčné cytoplazmy a tvoří tak dvě rozdílné translační oblasti. Tyto asociované Laminy A / C a ER tvořící jakousi bariéru po NEBD, která mizí v prometafázi I. Pravděpodobně jde o mechanismus, který zaručuje frakcionaci cytoplazmy po NEBD u takto velké buňky.

### **3.1.6. Dynamika laminů v průběhu embryonálního vývoje**

Na rozdíl od Laminu A, Laminy B jsou exprimovány ve všech buňkách v průběhu celého vývoje. Laminy B jsou považovány za nepostradatelné pro životaschopnost buněk, tyto závěry byly demonstrovány u lidských buněk a buněk hádátka obecného. Laminy B1 a B2

jsou též nepostradatelné v procesu organogeneze, jak bylo dokázáno u myší, které postrádaly Laminu B1 a / nebo Lamin B2. Tyto myši zemřely krátce po narození následkem těžkých neurologických vad (Liu et al., 2000; Harborth et al., 2001; Coffinier et al., 2011; Kim et al., 2011, Kim et al., 2013).

Rober et al., (1989) provedli imunofluorescenční studii laminové exprese v průběhu embryonálního vývoje myši, byla zkoumána exprese Laminů A / C. Exprese byla pozorována v embryonálních tkáních v čase, kdy začíná daná tkáň diferenciaci. Před zahájením diferenciace je exprimován pouze Lamin B. Tyto výsledky doplňují a rozšiřují studium Schatten et al. (1985), který poznamenal, že dochází k expresi Laminu B, ale ne Laminu A / C v blastocystách myší, a Stewart a Burka (1987), kteří uvedli, že Lamin B je jediný druh laminu exprimovaný v myší blastocystě. Přesto byla v nedávné studii potvrzena velice nízká hladina laminů A/C i v raných myších embryonálních buňkách (Eckersley-Maslin et al., 2013).

Načasování nástupu exprese Laminu A / C je závislé na tkáni. Nicméně různé orgány začínají expresi Laminu A / C v různých časech. Tudíž například jednotlivé buňky určené pro vytvoření svalů očí, končetin a trupu navozují expresi Laminu A / C jasně ve stejný den, stejně jako určité buňky hladkého svalstva cév. Ve značném kontrastu s tím jsou myocyty, které postrádají Laminu A / C a exprese těchto laminů v srdečním svalstvu se zdá být v podstatě postnatální událost, která začíná krátce po narození a pak zrychluje. Stejně tak k akvizici Laminů A / C v mozku dochází v podstatě jen několik dní po narození. Tento poněkud pozdní začátek exprese Laminů A/C v mozku není bezprecedentní. Některé proteiny cytoskeletu, jako je například Velký neurofilamentový polypeptid NF – H (Shaw and Weber, 1982; Pachter and Liem, 1984), některé tau – proteiny (Mareck et al. 1980), jakož i Gliový protein intermediálních filament (GFAP), jsou v první řadě získávány po narození. V průběhu embryonálního vývoje je tedy významná korelace mezi expresí Laminu A / C a procentem proliferujících buněk (Raju et al., 1981).

Následný podrobnější výzkum Fosterová et al. (2006) zabývající se expresí Laminu A a C v průběhu raného prasečího embryonálního vývoje popisuje, že za využití specifických protilátek pro Lamin A a pro Lamin C byla potvrzena přítomnost obou typů těchto laminů v raném embryonálním vývoji, a to v intranukleárních ložiscích a v nukleární periférii. V pozdějších stádiích sice nebyl pozorován Lamin A (jeho lokalizace se postupně snižuje),

Lamin C byl však pozorován ve všech stádiích embrya. Z toho vyplývá, že každý z těchto typů zastává zejména během vývoje jinou funkci, ačkoliv se jedná o produkty téhož genu. Největší intranukleární ložiska Laminu A byla pozorována v předimplantačním období a později se výskyt ložisek snižoval a Lamin A se lokalizoval spíše na periferii jádra. Ve stádiu čtyřbuněčného embrya dochází v prasečích embryích k zahájení transkripce, po transkripčně neaktivním období v průběhu zrání a fertilizace zárodečné buňky. Intranukleární ložiska Laminu A, přiléhající k těmto transkripčním oblastem, mají pravděpodobně vliv na tento proces, stejně tak se předpokládá, že laminová ložiska se zapojují do prvních kol embryonální replikace a jsou součástí nukleoskeletu (Tomanek et al. 1989; Freitag et al. 1991; Jarrell et al. 1991; Schoenbeck et al. 1992; Hyttel et al. 2000; Viuff et al. 2002).

### **3.1.7. Laminy v průběhu apoptózy**

Studie chování laminů během procesu programované buněčné smrti (apoptózy) zdůraznily nejen význam laminů ve fázi uskutečnění buněčného a zejména jaderného rozkladu během apoptózy, ale také přinesly nový pohled na molekulární organizaci jaderných laminů a jaderné membrány (Broers et al., 2005).

I když bylo prokázáno, že laminy tvoří substráty pro kaspázy (cysteinproteinázy štěpící peptidickou vazbu v průběhu apoptózy), je známo velmi málo o krocích, které řídí proteolýzu struktury jaderných laminů během apoptózy. Degradace laminů je pravděpodobně důležitým krokem při ukončení funkce buněk, díky degradaci strukturální podpory jádra dané buňky. Jelikož v buňkách transfekovaných laminy, které obsahují mutovaná štěpná místa pro kaspázy, byla jaderná degradace během apoptózy z velké části zpožděna (Rao et al., 1996). Kaspáza – 6 byla identifikována jako hlavní proteáza odpovědná za degradaci laminů (Slee et al., 2000), štěpení laminu a apoptóza by tedy mohly být zcela narušeny peptidovými inhibitory Kaspázy – 6. Laminy A se štěpí na místě, které se nachází v nestočeném spojovacím regionu L12 na pozici 227 – 230. Tato oblast obsahuje vazebná místa pro chromatin (Glass et al., 1993) a je také zapojena do tvorby laminových struktur (McKeon, 1991). Studie využívající bezbuněčné extrakty buď Kaspázy – 3 nebo Kaspázy – 6 ukázaly, že proteolýza Laminu B byla ovlivněna odstraněním obou těchto kaspáz. To nasvědčuje tomu, že by mohlo být degradace Laminu B ve fázi uskutečnění apoptózy rovněž dosaženo prostřednictvím aktivity Kaspázy – 3 (Slee et al., 2000). Lavastre et al. (2005) prokázali, že degradace Laminu B1 by mohla být zvrácena pomocí inhibitoru Kaspázy – 6, ale nikoliv inhibitoru Kaspázy – 8.



Byla provedena komplexní studie o dynamice a důsledcích štěpení laminů v průběhu apoptózy v živých buňkách, pro získání lepšího pochopení rychlého a koordinovaného členění složité struktury jádra (Broers et al., 2002). Indukce apoptózy v buňkách transfekovaných Laminem A – GFP odhalila ztrátu lokalizace značené struktury na periferii jádra, při současném přemístění do nukleoplazmy a cytoplazmy buňky. Velmi rychle po přemístění Laminu A byla viditelná kondenzace chromatinu. Imunoblottingem apoptotických buněk bylo zjištěno, že byla štěpena pouze část laminových proteinů, přičemž většina z těchto proteinů byla zřejmě ještě neporušená, ale zároveň depolymerovaná. Dochází tedy k malému nárůstu v rozpustnosti depolymerovaných, ale neštěpených laminových monomerů před hlavním nástupem kondenzace DNA během apoptózy. Na rozdíl od Laminů A, nebyl pozorován žádný signál Laminu B1 – GFP v cytoplazmě časných apoptotických buněk, ale je stále možné pozorovat strukturu podobnou Laminům B1 po obvodu jádra po nástupu kondenzace DNA. Pozorování, že fragmenty Laminu B1 zůstávají viditelné jako nukleární struktury během apoptózy, je v souladu se zjištěními Buendia et al. (1999), kteří dokázali, že v průběhu apoptózy většina proteolytických fragmentů Laminu B2 zůstává spojena s nerozpustnou strukturou, zatímco většina proteolytických fragmentů Nup153, a komponentů NPC se uvolňuje do cytoplazmatického prostoru.

Bylo popsáno, že účinná laminová desintegrace během apoptózy vyžaduje jak hyperfosforylaci laminu pomocí PKC (Protein kináza C), tak kaspázou zprostředkovanou proteolýzu (Cross et al., 2000; Brodie and Blumberg, 2003). Nicméně pokud je fosforylace důležitá pro desintegraci laminů během apoptózy, nedá se očekávat rozpustnost laminů v přítomnosti Staurosporinu, známého inhibitoru, který může být použit k indukci apoptózy (Broers et al., 2002). Park a Baines (2006) prokázali, že infekce virem *herpes simplex* (HSV – 1) navozuje fosforylaci Laminů B díky PKC a tato vysoká fosforylace Laminu B v buňkách infikovaných HSV – 1 byla částečně snížena pomocí inhibitorů PKC. Tyto údaje naznačují model, ve kterém jsou kinázy, které štěpí nukleární vrstvu během apoptózy, odváděny do jaderné membrány, a tam fosforylují Lamin B a tím pomáhají s modifikací nukleárních laminů během apoptózy (Broers et al., 2005).

Je možné spekulovat, zda odlišné chování Laminů A a B během apoptotické kaskády odráží rozdíly v molekulární organizaci mezi laminovými subtypy. Laminy typu A, C a B se liší v jejich COOH – terminální doméně. Zralé A a B laminy si udržují hydrofobní izoprenový CAAX box, zatímco Laminy C postrádají toto vazebné místo pro jadernou membránu. Již

dříve bylo uvedeno, že motiv CAAX v této oblasti ocasu je nezbytný pro účinnou integraci Laminů B do již vytvořené nukleární vrstvy, jelikož CAAX mutanty těchto laminů vykazaly snížené cílení do nukleární vrstvy a zdálo se, že nedojde k asociaci s jadernou membránou. To dokazuje, že změny v CAAX motivu jsou zodpovědné za asociaci Laminů B s jadernou membránou (Mical and Monteiro, 1998, Barrowman et al., 2012). Bylo prokázáno, že jaderná membrána stále obklopuje chromatinové fragmenty vytvořené v průběhu apoptózy (Oberhammer et al., 1993). Pravděpodobně je dostatečná laterální nebo head – to – tail kompletace molekul Laminu B1 (Stuurman et al., 1996), aby zajistila, že oba NH<sub>2</sub>-terminální a COOH-terminální fragmenty Laminů B1 zůstávají připojeny k jaderné membráně, a to i po apoptickém štěpení laminů (Stuurman et al., 1996).

Laminy typu A i B interagují s různými asociovanými proteiny, které by mohly způsobovat rozdíly v migraci během apoptózy. COOH – konec LAP2 $\alpha$  se váže přímo na zbytky 319 – 566 v Laminech A, které zahrnují COOH – konec tyčové domény a celou ocasovou (Furukawa and Kondo, 1998). Během apoptózy, kdy se LAP2 $\alpha$  štěpí kaspázou, apoptotický COOH – terminální fragment LAP2 $\alpha$  zůstává spojen se zbytkovou strukturou po extrakci pomocí detergentních/solných pufrů, zatímco NH<sub>2</sub> – terminální fragment se extrahuje z intranukleárních struktur (Gotzmann et al., 2000). LAP2 $\beta$  se specificky váže na region uvnitř stočené domény 1B Laminu B (Furukawa and Kondo, 1998) a na chromatin, ale má nízkou afinitu pro Laminy A (Foisner and Gerace, 1993, Hutchison et al., 2001). Na rozdíl od LAP2 $\alpha$ , LAP2 $\beta$  je integrován do vnitřní jaderné membrány (INM) pomocí COOH – terminální domény. Bylo publikováno, že LAP2 $\beta$  je štěpen během apoptózy, pravděpodobně aktivitou Kaspázy – 3. Dále bylo prokázáno, že štěpení jak LAP2 $\beta$ , tak Laminu B2 začíná v apoptotické procesu přibližně ve stejném časovém bodě (Buendia et al., 1999). Dalším asociovaným proteinem je LBR (Lamin B receptor), integrální protein vnitřní jaderné membrány (INM), který interaguje s Laminy B, avšak ne s Laminy A. Bylo popsáno, že NH<sub>2</sub> – koncová doména LBR se specificky štěpí v pozdější fázi apoptózy, následně po štěpení Laminu B (Duband-Goulet et al., 1998). V další studii se nepodařilo zaznamenat apoptotické produkty štěpení LBR ani po delším období, zatímco Lamin B2 byl již rozštěpen (Buendia et al., 1999). Interakce LAP2 $\beta$  a LBR, které jsou štěpeny v pozdních fázích apoptózy, s relativně brzy štěpeným Laminem B1 může být příčinou, proč tyto fragmenty poskytují strukturální oporu jaderné membrány, což je vlastnost, která by mohla být důležitá při tvorbě apoptotických figur (Rao et al., 1996, Buendia et al., 1999).

## **4. Materiály a metody**

### **4.1. Materiál**

#### **4.1.1. Experimentální skupiny**

Byly použity dvě odlišné experimentální skupiny myši, z nichž jednu skupinu tvořily myši ve stáří 4 až 18 týdnů (mladé myši) a druhou skupinu tvořily myši ve věku od 1 roku (staré myši). Obě skupiny byly 48 hodin před izolací oocytů z vaječníků stimulovány pomocí PMSG (pregnant mare serum gonadotropin, Sigma – Aldrich). Se zvířaty bylo pracováno dle legislativy Zákona na ochranu zvířat proti týrání č. 246 / 1992 sb.

#### **4.1.2. Získání vaječníků a oocytů**

Vaječníky byly odebírány ze starých a mladých myši 48 hodin po injekci PMSG pro indukci ovulace. Do 30 – ti minut od vyjmutí vaječníků byly izolovány GV oocyty z folikulů, které byly narušeny pomocí jehel. Vhodné oocyty byly následně pomocí kapiláry přeneseny z pracovního média s IBMX (3 – isobutyl – 2 – methylxanthin, inhibitor fosfodiesteráz, Sigma) do kultivační jamky (Fisher Scientific) s kultivačním médiem M16 (Millipore), také s obsahem IBMX, do inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) a poté byly použity k dalšímu studiu.

#### **4.1.3. Média použitá pro *in vitro* zrání myších oocytů**

##### **M16**

Pro zrání myších oocytů v *in vitro* podmínkách bylo používáno kultivační médium M16. Toto médium je skladováno po alikvótech 500 µl při teplotě -20 °C v 1 ml zkumavkách (Millipore) až do doby použití, kdy je na výhřevné ploténce nejdříve rozmrazeno a poté napipetováno do kultivačních jamek, které jsou umístěny s mírně pootevřeným víkem, z důvodu přívodu CO<sub>2</sub>, do inkubátoru. Skladování při -20 °C až do doby použití (2 měsíce).

##### **PVA/PBS (promývací zamrazovací médium)**

Toto médium bylo připraveno smícháním PBS (phosphate – buffered saline, Sigma) a PVA (polyvinyl alkohol, Sigma). Jedna tableta PBS byla nejdříve rozpuštěna ve 200 ml vody a poté byla nádoba s roztokem sterilizována. Roztok se následně smíchal s PVA v poměru 1 mg PVA na 25 ml PBS. Toto médium se skladuje při teplotě 4 °C po dobu půl roku.

### Transfer médium (promývací zrací médium)

Myší transfer médium bylo připraveno z BSA (bovinní sérový albumin, Sigma – Aldrich) a prasečího transfer média v poměru 0,25 g BSA na 100 ml transfer média. Prasečí transfer médium se pak skládalo z roztoku A (tabulka 1) a z roztoku B (tabulka 2).

**Tabulka 1 Složení roztoku A pro přípravu prasečího transfer média**

<b>Roztok A</b>			
<b>Sloučenina</b>	<b>Molekulární hmotnost</b>	<b>g/1000ml</b>	<b>Koncentrace (mM)</b>
<b>NaCl</b>	58,45	6,400	108,73
<b>KCl</b>	74,55	0,400	4,78
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	147,00	0,300	1,70
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	136,09	0,700	1,19
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	246,50	0,097	1,19
<b>Glukóza</b>	180,20	2,000	5,55
<b>HEPES acid (N – (2 – hydroxyethyl) piperazine – N' – (2 – ethanesulfonic acid))</b>		2,000	
<b>PVA (polyvinyl alkohol)</b>		1,000	

Po navážení a smíchání daných komponent roztoku A (tabulka 1) byla tato směs dolita do 1000 ml destilovanou vodou, rozlita po 500 ml do lahví a ty se poté autoklávovaly. Po sterilizaci se každá láhev (tj. 500 ml) smíchala s roztokem B (tabulka 2) a tím jsme dostali prasečí transfer médium, potřebné pro přípravu transfer média myšího.

**Tabulka 2 Složení roztoku B pro přípravu prasečího transfer média**

<b>ROZTOK B</b>	
<b>Sloučenina</b>	<b>množství</b>
<b>NaHCO<sub>3</sub> (7,5 %)</b>	7,5000 ml
<b>Penicilin</b>	0,0225 g
<b>Streptomycin</b>	0,0325 g
<b>Amphotericin (25 µg/ml)</b>	0,5000 ml
<b>Na pyruvát</b>	0,1000 g

### **Pracovní médium**

Jako pracovní médium pro manipulaci s oocyty, u kterých byla požadována dočasná inhibice zrání, bylo využito myší transfer médium s IBMX (0,125 mg / ml) v poměru 1:1000, to znamená 20 ml transfer media na 20 µl IBMX. Toto médium se skladuje při teplotě 4 °C až do doby použití (několik dní).

#### **4.1.4. Pracovní média a protilátky pro imunolokalizaci**

##### **4% paraformaldehyd**

4 gramy paraformaldehydu (Sigma) bylo rozmícháno v 80 ml PBS a při míchání zahříváno. Teplota nesměla přesáhnout 70 °C, vznikl mírně zakalený roztok, ve kterém se rozpustila většina paraformaldehydu. Poté se nechal roztok vychladnout a následně byly za stálého míchání přidávány 3 kapky 1 N NaOH, po několika minutách docházelo k čerení roztoku (pH 6,9). Výsledkem byl 4% roztok paraformaldehydu. Skladování při -20 °C až do doby použití (1 měsíc).

## **Zásobní roztok Tritonu X – 100**

Pro permeabilizaci buněčné membrány zásobním roztokem Tritonu X – 100 (Sigma – Aldrich) bylo potřeba smíchat 2  $\mu$ l Tritonu (0,1 %) s 5 ml PBS a následně umístit na minimálně 10 minut na shaker při pokojové teplotě. Výsledný roztok byl určený k okamžitému použití, neskládá se.

### **Primární protilátky**

Na každý vzorek, který byl podroben imunocytochemickému barvení, bylo zapotřebí smíchat 100  $\mu$ l roztoku PVA / PBS s každou použitou primární protilátkou. Pro účely pokusu bylo smícháno 100  $\mu$ l PVA / PBS se 2  $\mu$ l králičí protilátky anti –  $\alpha$  – Tubulinu (T3952, 1:150, Sigma) a se 2  $\mu$ l myší protilátky anti – LMN A / C (SAB4200236, 1:150, Sigma). Tento roztok byl takto připraven k okamžitému použití.

### **Sekundární protilátky**

Pro přípravu roztoku sekundárních protilátek bylo zapotřebí smíchat na každý vzorek 500  $\mu$ l PVA / PBS se 2  $\mu$ l každé sekundární protilátky, to znamená 2  $\mu$ l anti – rabbit sekundární protilátky IgG (Alexa Fluor® 488, 1:250, Molecular probes) a 2  $\mu$ l anti – mouse sekundární protilátky IgG (Alexa Fluor® 594, 1:250, Molecular probes). Připraveno k okamžitému použití.

### **Montovací médium**

Montovací médium (hardening, Vectrashield labs) obsahuje DAPI (1,5  $\mu$ g / ml; 4', 6 – diamidin – 2 – fenylyndol), což je fluorescenční barvivo, které se váže na AT oblasti DNA. Na každé krycí sklíčko (Fisher Scientific) se vzorky bylo použito 25  $\mu$ l média. Po nanesení na vzorek bylo nutno nechat médium ztvrdnout při 4 °C na 1 – 2 hodiny. Montovací médium se skladuje bez přístupu světla při 4 °C až po dobu použití (několik měsíců).

#### **4.1.5. Materiály a média pro imunoblotting**

##### **Roztok 20 % towbinu (pH 9,2)**

Pro přípravu 1 litru tohoto roztoku bylo zapotřebí smíchat 5,82 g Tris base (tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma) se 2,93 g Glycinu a tyto komponenty následně rozpustit v 750 ml destilované vody. Potřebné pH bylo získáno pomocí 10M NaOH / HCl,

poté bylo přidáno 200ml metanolu a doplněno destilovanou vodou do 1 litru. Výsledný roztok se skladuje při 4 °C po dobu 1 měsíce.

### **Roztok 10 % towbinu (pH 9,2)**

Pro přípravu 1 litru roztoku bylo zapotřebí smíchat stejné množství Tris base a Glycinu jako v předchozím případě, avšak tyto komponenty následně rozpustit v 850 ml destilované vody a po úpravě pH 10M NaOH přidat 100 ml metanolu a dolít do 1 litru destilovanou vodou. Platí stejné skladování.

### **TTBS**

Pro přípravu roztoku 1 litru TTBS bylo smícháno 8 g NaCl, 0,5 ml Tween a 10 ml 2M TRIS (pH 7,6). Tato směs byla následně doplněna do 1 litru destilovanou vodou. Skladuje se při 4 °C po dobu maximálně 3 dnů.

### **2M TRIS (pH 7,6)**

Pro přípravu bylo nutno v 80 ml destilované vody rozpustit 27,02 g Tris hydrochloridu se 3,46 g Tris base, pomocí 10M NaOH dotitrovat na pH 7,6 a následně doplnit do 100 ml destilovanou vodou. Skladování 1 měsíc při pokojové teplotě.

### **Primární protilátky**

Byly použity myší primární protilátky anti – Lamin A / C (SAB4200236, 1:1000/1:20000, Sigma) a králičí anti – pLamin A/C (2026, 1:500, Cell Signaling) a anti – GAPDH (69545, 1:20000, Sigma). Inkubace v primárních protilátkách a roztoku 1 % mléka s TTBS probíhala přes noc při 4 °C.

### **Sekundární protilátky**

Pro inkubaci s konjugáty sekundárních protilátek byly použity 1,33 µl anti – mouse (1:7500, Sigma) a 1,33 µl anti – rabbit (1:7500, Sigma) sekundární protilátky rozpuštěné ve 20 ml roztoku 1 % mléka. Inkubace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě na překlápěče.

## **4.2. Metody**

### **4.2.1. Izolace a *in vitro* kultivace oocytů**

GV oocyty byly získány z vaječníků mladých a starých myší 48 hodin po injekci PMSG. Po izolaci z vaječníků byly oocyty umístěny do pracovního média s IBMX. Následně byly vybrané oocyty přemístěny do média M16 bez obsahu IBMX a umístěny do inkubátoru, který simuluje přirozené podmínky při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

### **4.2.2. Imunolokalizace laminu A / C**

Oocyty byly nejprve promyty v médiu PVA / PBS, následně byly fixovány 4% paraformaldehydem (PFA) v PVA / PBS po dobu 15 – 30 minut. Poté byly fixované oocyty opět promyty v PVA / PBS (při pokojové teplotě na třepačce) a umístěny do kultivační jamky s roztokem PVA / PBS a 0,1 % roztokem Tritonu X – 100 a následně na 10 minut umístěny při pokojové teplotě na třepačku tak, aby došlo k permeabilizaci membrány oocytů. Poté byly oocyty opět promyty v PVA / PBS a přes noc inkubovány při 4 °C na třepačce s roztoky primárních protilátek. Druhý den, po opětovném promytí v PVA / PBS od primárních protilátek na třepačce, byly oocyty přemístěny do kultivační jamky s roztoky sekundárních protilátek a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě bez přístupu světla (až do konce experimentu). Po opětovném promytí v PVA / PBS byly oocyty umístěny na podložní sklíčko do mounting média (s DAPI) a překryty krycím sklíčkem. Médium se následně nechalo 1 – 2 hodiny při 4 °C vytvrdnout a poté bylo krycí sklíčko fixováno lakem, po zaschnutí byly vzorky pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu.

### **4.2.3. Live cell imaging**

Oocyty kultivované v M16 s IBMX byly promyty pomocí transfer media od IBMX a poté s co nejmenším množstvím tohoto média přeneseny do kultivační jamky upevněné na podložním sklíčku (Fisher Scientific) s kapkou M16 (2 µl) překrytou minerálním olejem (Sigma). Následně byly obě nasazené skupiny překryty krytem. Vzorky byly vizualizovány za použití konfokálního mikroskopu TCS SP5 Leica vybaveného EMBL inkubátorem a HCX PL APO 20 × /0.7 IMM CORR λBL a HCX PL APO 40 × /1.1 objektivy. Snímky byly sestaveny ve Photoshopu CS3 a spolu s videi kvantifikovány v Image J software.



#### **4.2.4. Elektroforetická separace**

Oocyty v různém stádiu meiotického zrání byly nejdříve denaturovány. Ke každému vzorku o objemu 0,5  $\mu$  bylo přidáno 9,5  $\mu$ l 1x koncentrovaného LDS vzorkového pufru (Life Technologies), vzorky byly následně zahřívány na 100 °C po dobu 5 minut, poté byly takto upravené vzorky zvortexovány a připraveny k nasazení do jamek. Pro horizontální plošnou elektroforetickou separaci byl použit 10 % polyakrylamidový gel (Life Technologies). Elektroforetické zařízení bylo po nasazení vzorků, zalití 1 – krát koncentrovanými elektrolytickými pufrů (MES SDS running buffers, Life Technologies) s antioxidantem (Life Technologies) a zapojení elektrod, nastaveno na 25 mA a 180 V a po spuštění přístroje docházelo k separaci vzorků podle jejich molekulární hmotnosti a hustoty gelu, přičemž náboj byl uniformní. Separace probíhala po dobu 1 hodiny. Po vyjmutí gelu z přístroje, po skončení separace, byl tento gel se separovanými vzorky následně využit na imunoblotting.

#### **4.2.5. Imunochemická detekce proteinů v gelu – Western blot**

Po elektroforetické separaci vzorků na polyakrylamidovém gelu byly tyto vzorky přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Millipore) za použití polosuchého blottovacího systému (Biometra GmbH), blotování trvalo po dobu 30 minut na 5 mA / cm<sup>2</sup> při 18 W. Nejdříve však bylo nutné gel přenést do nádoby s 10 % (20 %) towbinem, umístit na 10 minut na shaker a následně aktivovat membránu ponořením do metanolu a posléze také do 10 % (20 %) towbinu. K membráně byl do roztoku towbinu přidán také filtrační papír (2 x) a následně byla vanička s membránou a filtračním papírem v towbinu přenesena na 5 minut na shaker. Poté se na blotovací zařízení navršil nejdříve filtrační papír, membrána a gel a na něj další filtrační papír. Blotování trvalo 30 minut. Díky přenesení na membránu byly proteiny zakotveny v membráně a byly tedy následně přístupné k reakci s imunodetekčními činidly. Po přenesení byla všechna nespecifická místa blokována ponořením membrány do roztoku obsahujícího protein, v našem případě do 1% odstředěného mléka rozpuštěného v TTBS (tween-tris-buffer saline), v poměru 1 g mléka na 100 ml TTBS, při Ph 7,4 na 1 hodinu, za stálého třepání. Následně byla membrána inkubována v primárních protilátkách a 1 % mlékem při 4 °C přes noc. Byly použity primární protilátky anti - Lamin A / C a GAPDH. Po uplynutí potřebné doby byla membrána promyta v TTBS 3 – krát po 10 – ti minutách od nespecificky zachycené primární protilátky a inkubována 1 hodinu s konjugátem sekundárních protilátek za stálého třepání. Po důkladném promytí v TTBS (3 – krát po 10 – ti

minutách) byly imunodetekované proteiny na membráně přeneseny do fotokomory, kde byly za použití ECL kitu z membrány vizualizovány na film.

#### **4.2.6. Fotokomora**

Po přenesení membrány do fotokomory bylo nejdříve nutné připravit roztok ECL (Amersham), na každých 50 cm<sup>2</sup> membrány byl použit 1 ml roztoku, který byl připraven smícháním dílu A a dílu B (1 : 1). Membrána byla položena na sklo a v tomto připraveném roztoku byla smáčena 5 minut. Následně byla membrána přenesena do fólie a do kazety, okraje fólie byly přelepeny. Poté byl na fólii umístěn film a kazeta byla zavřena. Po uplynutí potřebné doby (1, 5, 60 minut) byl film umístěn do vývojky na 1 minutu, poté byl opláchnut vodou a předán do ustalovače na 10 sekund. Výsledný film byl opláchnut destilovanou vodou a nechal se uschnout.

#### **4.2.7. Test kinázové aktivity**

Oocyty byly nejdříve lyzovány v lyzačním pufru, který obsahoval 0.5 % Triton X-100, 5 mM Tris, 1 % deoxycholate sodium sůl, 0.15 M NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 4 mM inhibitory proteáz (Roche), pH 7,5. Celkový objem byl 10 ul lyzačního roztoku. Reakce byla zahájena přidáním 10 ul roztoku, který obsahoval 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 uM cAMP – dependentní protein kinázy (PKI), 0,2 mM ATP, 20 ug / ml každého z pepstatinu, chymostatinu, aprotinin, 40 ug / ml leupeptinu, 0,4 mM orthovanadičnan sodný (Amersham) a 5 ug histonu H1 (Boehringer Mannheim). Reakce probíhala při teplotě 37 °C po dobu 20 minut a zastavena byla varem, po 3 minutách bylo přidáno 20 ul 2 – krát koncentrovaného Laemmli vzorkového pufru (Sigma – Aldrich). Vzorky byly podrobeny 10 % SDS – PAGE a poté imunoblottingu.

#### **4.2.8. Vyhodnocení experimentů**

##### **Analýza obrazu**

Fotografie získané z konfokálního mikroskopu (TCS SP5; Leica) byly hodnoceny na základě fluorescenčního signálu. Byl pozorován poměr mezi asociovanými a neasociovanými laminy A/C na základě lokalizace jejich fluorescenčního signálu a následně bylo stanoveno procento asociovaných/neasociovaných laminů u obou experimentálních skupin.

Snímky a videa získané z epifluorescenčního mikroskopu Leica SP5 byly hodnoceny na základě časových intervalů, potřebných od rozpadu jaderné membrány oocytů obou skupin po

vydělení prvního pólového tělíska. Tyto časové intervaly byly měřeny u oocytů obou experimentálních skupin současně pomocí live cell imaging. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel.

Negativy získané po imunoblottingu vyvoláním ve fotokomoře byly hodnoceny na základě pruhů (bandů), které byly vytvořeny díky rozdílné molekulové hmotnosti detekovaných proteinů (díky různé velikosti = různá pohyblivost v polyakrylamidovém gelu) a díky imunologickému značení pomocí protilátek. Pomocí markeru o známé molekulové hmotnosti pak byla stanovena molekulová hmotnost separovaných proteinů.

### **Statistická analýza**

Statistická analýza byla prováděna v programu STATISTICA, verze 9.0. Použita byla metoda studentův t-test. Nulová hypotéza ( $H_0$ ) byla potvrzena na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5. Výsledky

Je známo, že po zahájení meiotického zrání v oocyty dochází nejprve k rozpadu jaderných pórů a k fosforylaci laminů asociovaných s vnitřní jadernou membránou pomocí MPF, což je nezbytný krok pro disociaci těchto struktur a také pro s tím spojený rozpad jaderné membrány. Pomocí elektroforetické separace a imunochemické detekce bylo však zjištěno, že Laminy A / C v oocytech mladých myší podléhají fosforylaci a depolymeraci po zahájení meiotického zrání později, než Laminy A / C v oocytech starých myší (obrázek 1). Zatímco u starých myší byly fosforylované Laminy A / C zaznamenány již 1 hodinu po promytí oocytů od IBMX, u mladých myší byly fosforylované Laminy A / C v detekovatelném množství zaznamenány až 3 hodiny po promytí oocytů od IBMX. Výsledky testu aktivity Histon H1 a MAP kinázy také ukázaly, že ihned po promytí od inhibitoru zrání (IBMX) byla u oocytů starých myší aktivita obou proteinových kináz spojených se znovuzahájením meiotického zrání a fosforylací proteinů jaderného obalu vyšší, než u oocytů mladých myší (obrázek 2).

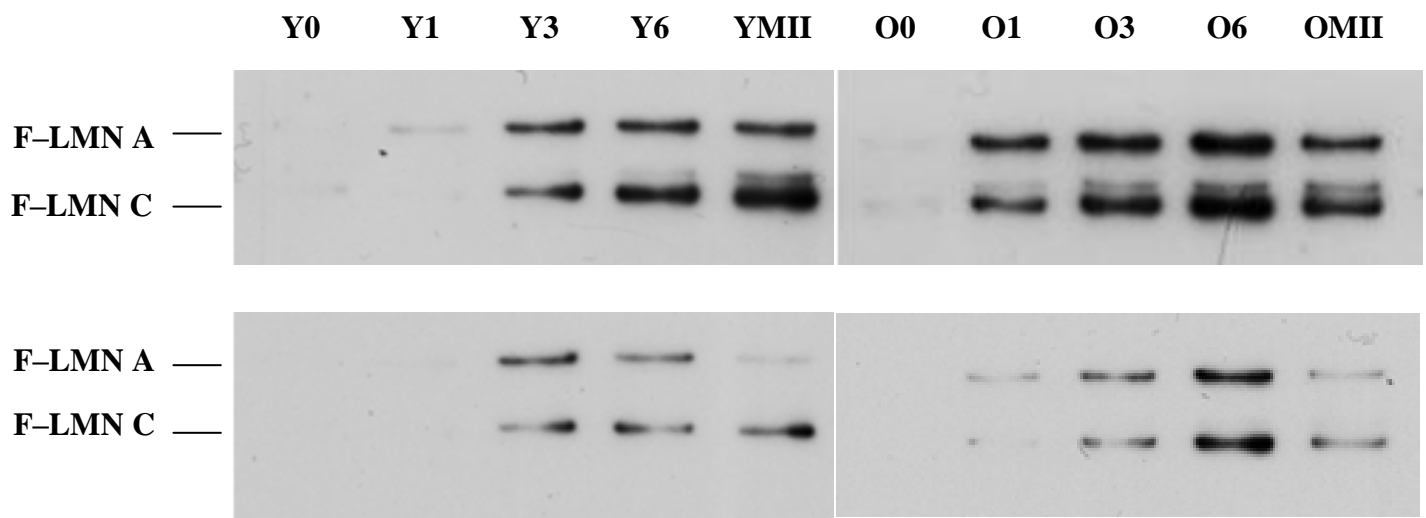
Pomocí imunocytochemického barvení oocytů bylo dále zjištěno, že po rozpadu jaderné membrány jsou lokalizovány asociované struktury Laminu A / C v cytoplazmě, kde obklopují oblast formujícího se vřeténka oocyty. Tím bylo potvrzeno, že po depolymeraci laminů vnitřní jaderné membrány a rozpadu celé buněčné membrány jsou laminové jednotky asociovány a spolu s endoplazmatickým retikulem tvoří bariéry obklopující chromatin a nukleoplazmu. Tvoří tak dvě odlišné translační oblasti, z nichž jedna je vně této bariéry (PTA) a druhá uvnitř bariéry (CTA), v blízkosti chromatinu. Avšak jak dokázalo podrobnější studium se zaměřením na stáří myší poskytujících oocyty, na rozdíl od oocytů mladých myší (obrázek 3), kde struktury vymizí ve stádiu prometafáze I, u oocytů starých myší dochází k vymizení těchto struktur podstatně dříve (obrázek 4). To bylo potvrzeno imunolokalizací laminů, kdy 2 hodiny po promytí oocytů obou skupin od IBMX bylo procento asociovaných Laminů A / C v oocytech mladých myší výrazně vyšší, než procento asociovaných Laminů A/C oocytů starých myší (graf 1).

Za využití imunochemické detekce bylo také potvrzeno, že laminy přítomné v oocyty, které jsou před NEBD asociované s buněčnou membránou a po rozpadu tvoří zmíněné mechanické bariéry, jsou Laminy A / C, tvořící charakteristické produkty o molekulové hmotnosti ~75 kDa (Lamin A) a ~65 kDa (Lamin C). Na rozdíl od somatických buněk je však Lamin C v oocytech přítomen ve velmi malých koncentracích (obrázek 5). Díky malému

obsahu Laminu C v oocytu se může při krátké expozici jevit jako nedetekovatelný. Pomocí těchto metod byla však potvrzena i přítomnost fragmentu o velikosti ~50 kDa, který byl sledován ve vyšší koncentraci zejména u oocytů mladých myší (obrázek 6). I přes potencionálně rychlejší průběh meiózy u oocytů starých myší byl obsah tohoto 50 kDa produktu v těchto oocytech podstatně menší, než u oocytů mladých myší. Nejvyšší koncentrace těchto fragmentů byly pozorovány u oocytů mladých myší ve stádiu zárodečného vajíčka až po vydělení pólového tělíska. Naopak oocyty starých myší vykazovaly menší koncentrace těchto fragmentů u stádia GV a GVBD a dále se tyto koncentrace v následujících stádiích ještě zmenšovaly.

Postupným snímáním živých oocytů v průběhu jejich meiotického zrání (live cell imaging) bylo zjištěno, že dochází u oocytů mladých myší po zahájení meiózy k rozpadu jaderné membrány a vydělení 1. polárního tělíska statisticky významně později ( $\pm 40$  minut), než u oocytů starých myší. Obě skupiny živých oocytů byly souběžně izolovány, kultivovány a následně pozorovány a snímány v pětiminutových intervalech. Ze získaných dat bylo provedeno vyhodnocení každého oocytu obou experimentálních skupin zvlášť a pomocí statistické analýzy bylo následně zjištěno, že oocyty starých myší přecházejí ze stádia GV do GVBD a následně do stádia MII statisticky významně rychleji, než oocyty mladých myší (tabulka 1, graf 2).

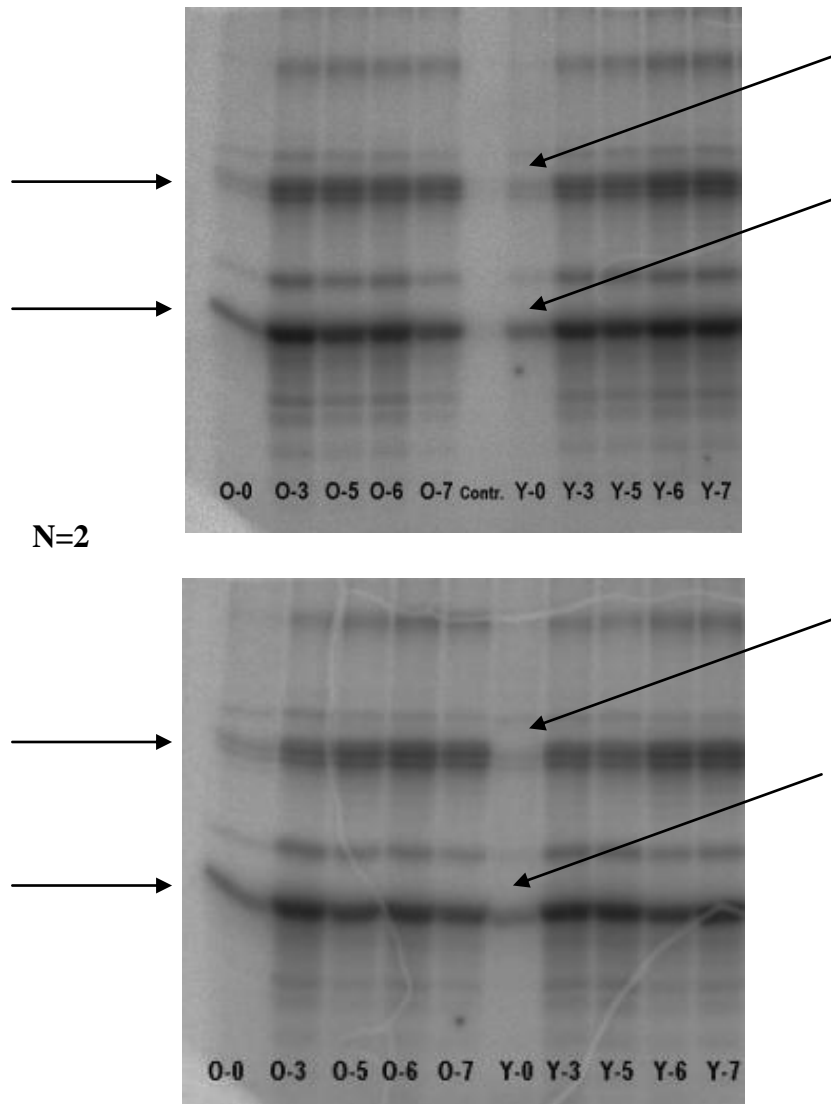
**Obrázek 1 Fosforylace laminu A / C v průběhu meiotického zrání**



N=2

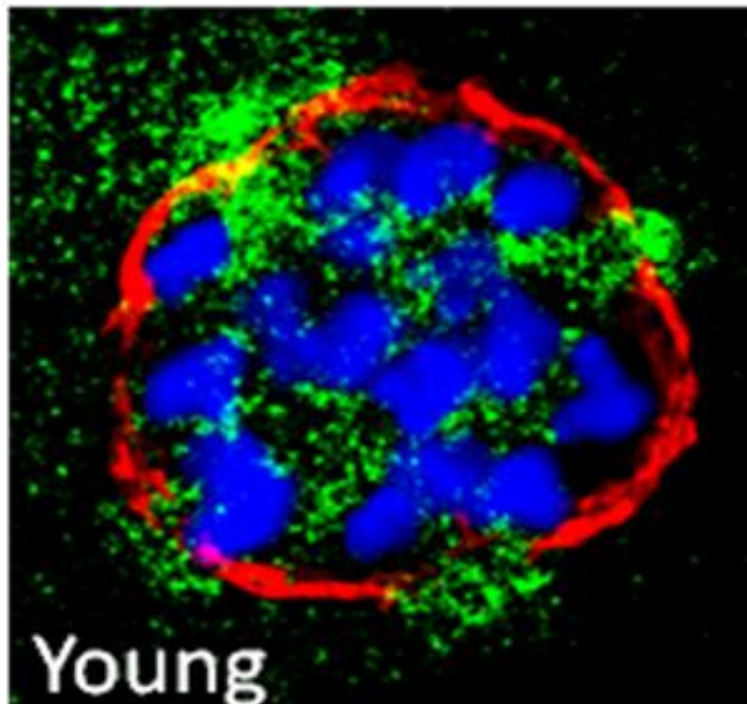
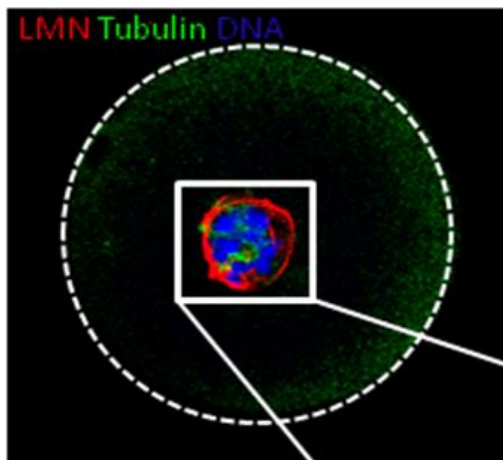
*N – počet oocytů v každém vzorku, Y0 – oocyty mladých myší ihned po promytí od IBMX, Y1 – oocyty mladých myší 1 hodinu po promytí od IBMX, Y3 – oocyty mladých myší 3 hodiny po promytí od IBMX, Y6 – oocyty mladých myší 6 hodin po promytí od IBMX, YMII – oocyty mladých myší ve stádiu metafáze II, O0 – oocyty starých myší ihned po promytí od IBMX, O1 – oocyty starých myší 1 hodinu po promytí od IBMX, O3 – oocyty starých myší 3 hodiny po promytí od IBMX, O6 – oocyty starých myší 6 hodin po promytí od IBMX, OMII – oocyty starých myší ve stádiu metafáze II. F-LMN A – fosfo – Lamin A, F-LMN C – fosfo – Lamin C.*

**Obrázek 2 Aktivita histon H1 a MAP kinázy po znovuzahájení meiotického zrání**



*N – počet oocytů v každém vzorku, Y-0 – oocyty mladých myší ihned po promytí od IBMX, Y-1 – oocyty mladých myší 1 hodinu po promytí od IBMX, Y-3 – oocyty mladých myší 3 hodiny po promytí od IBMX, Y-5 – oocyty mladých myší 5 hodin po promytí od IBMX, Y-6 – oocyty mladých myší 6 hodin po promytí od IBMX, Y-7 – oocyty mladých myší 7 hodin po promytí od IBMX, O-0 – oocyty starých myší ihned po promytí od IBMX, O-1 – oocyty starých myší 1 hodinu po promytí od IBMX, O3h – oocyty starých myší 3 hodiny po promytí od IBMX, O-5 – oocyty starých myší 5 hodin po promytí od IBMX, O-6 – oocyty starých myší 6 hodin po promytí od IBMX, O-7 – oocyty starých myší 7 hodin po promytí od IBMX. Šipky poukazují na rozdíly v aktivitě H1/MAP kináz u oocytů starých a mladých myší před rozpadem jaderné membrány.*

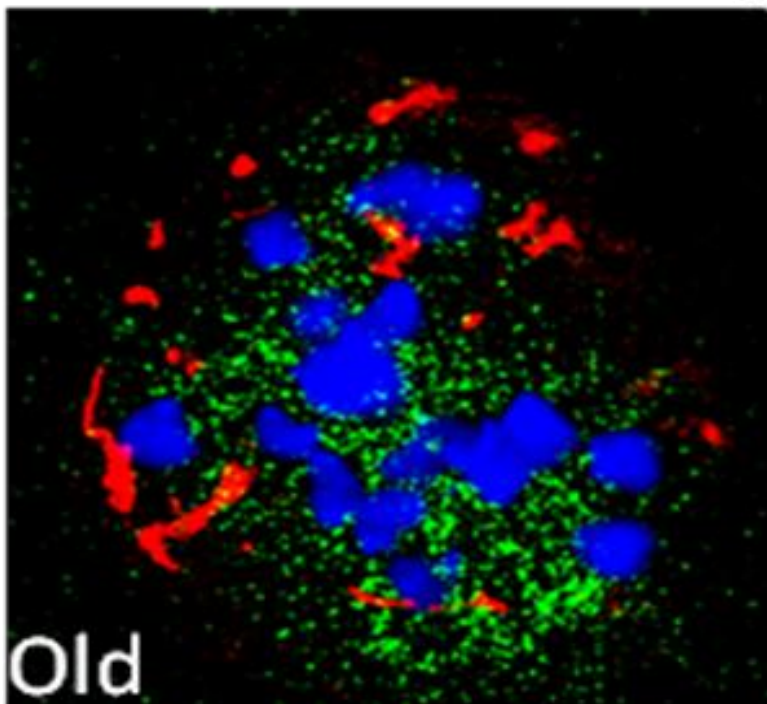
**Obrázek 3** Buněčná lokalizace laminu A / C v oocytu mladých myší 2 hodiny po promytí od IBMX



*Young – oocyt mladé myši. Lamin A / C byl lokalizován pomocí fluorescence použitím protilátky anti-Lamin A/C v oocytech 2 hodiny po promytí od IBMX. Zeleně je značen tubulin pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulin, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině rozpadu jaderné membrány. Zvětšení 400x.*

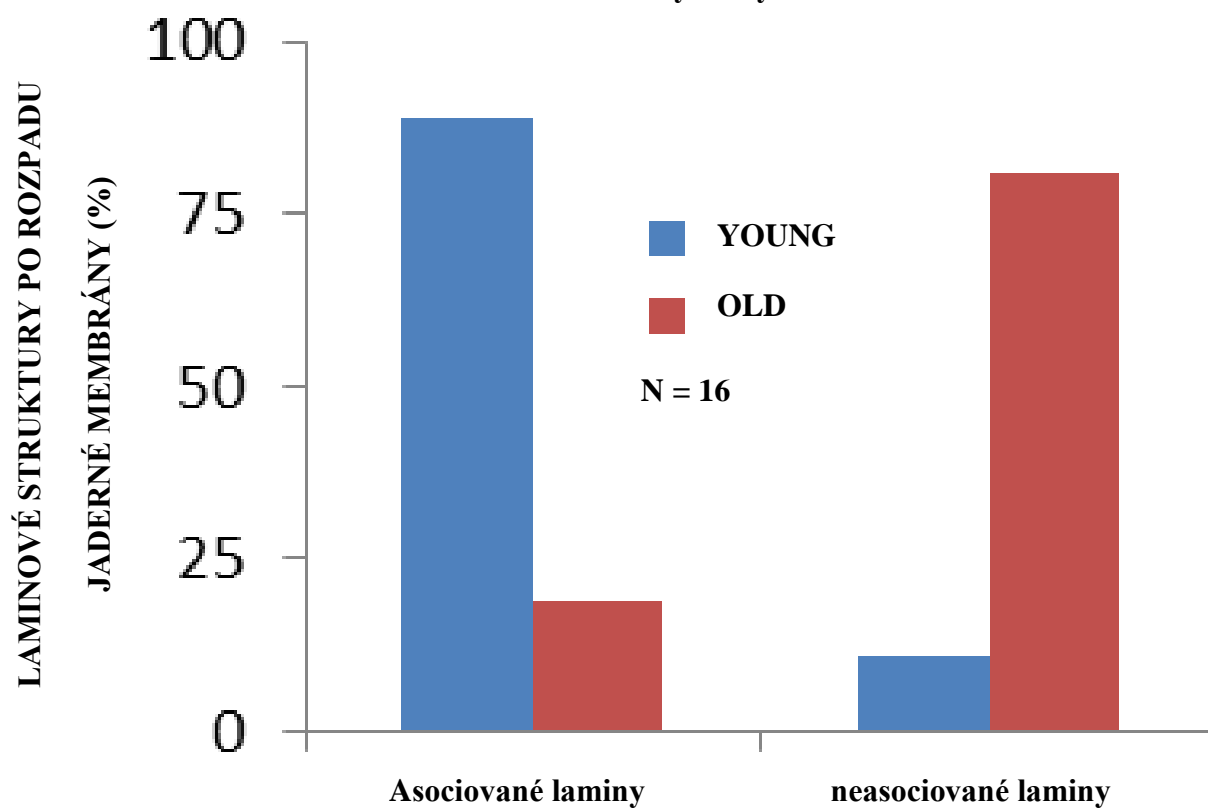


**Obrázek 4 Buněčná lokalizace laminu A / C v oocytu starých myši 2 hodiny po promytí od IBMX**



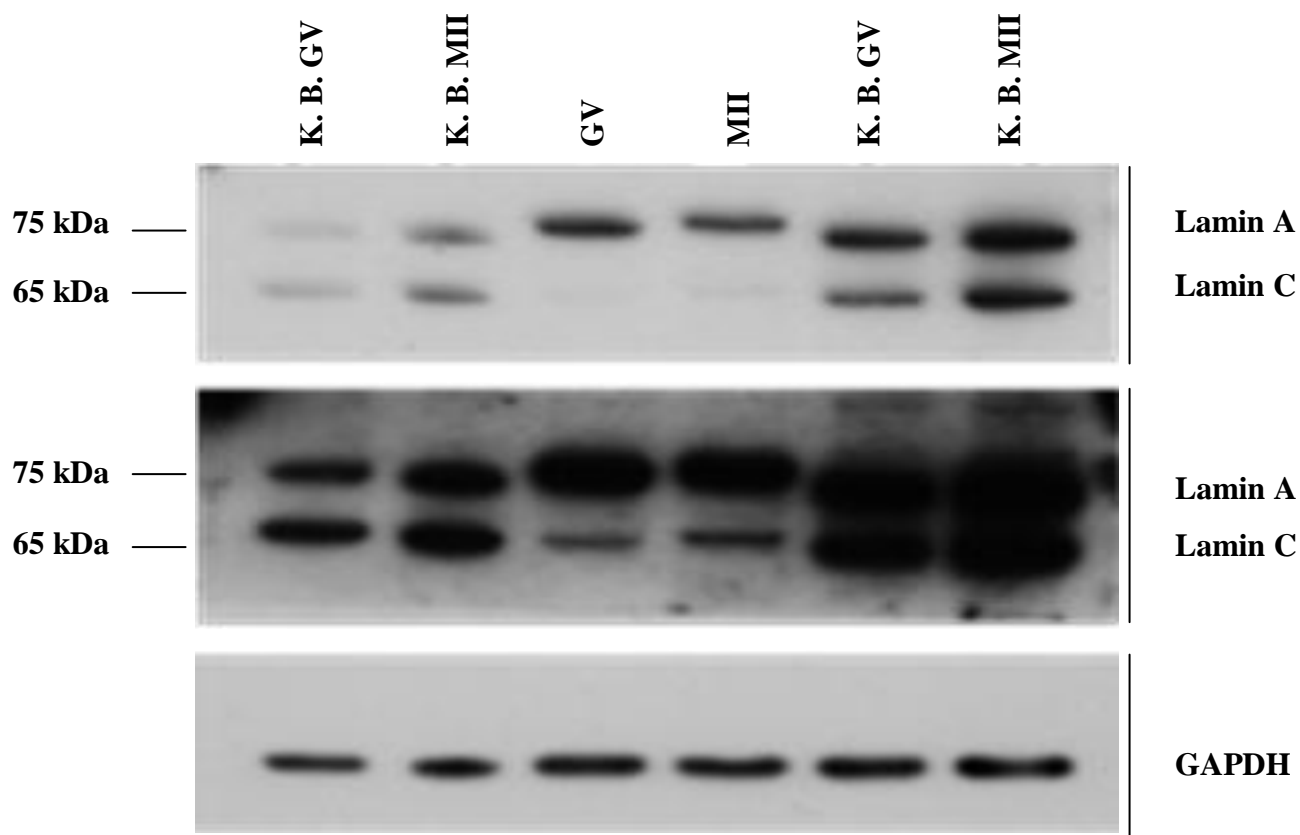
*Old – oocyt staré myši. Lamin A / C byl lokalizován pomocí fluorescence použitím protilátky anti-Lamin A/C v oocytech starých myši 2 hodiny po promytí od IBMX. Zeleně je značen tubulin pomocí protilátky anti- $\alpha$ -tubulin, modře je značen chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině rozpadu jaderné membrány. Zvětšení 400x.*

**Graf 1** Tvorba asociovaných laminových struktur po NEBD u oocytů starých a mladých myší



*N – počet oocytů v každé skupině, YOUNG – oocyty mladých myší, OLD – oocyty starých myší.*

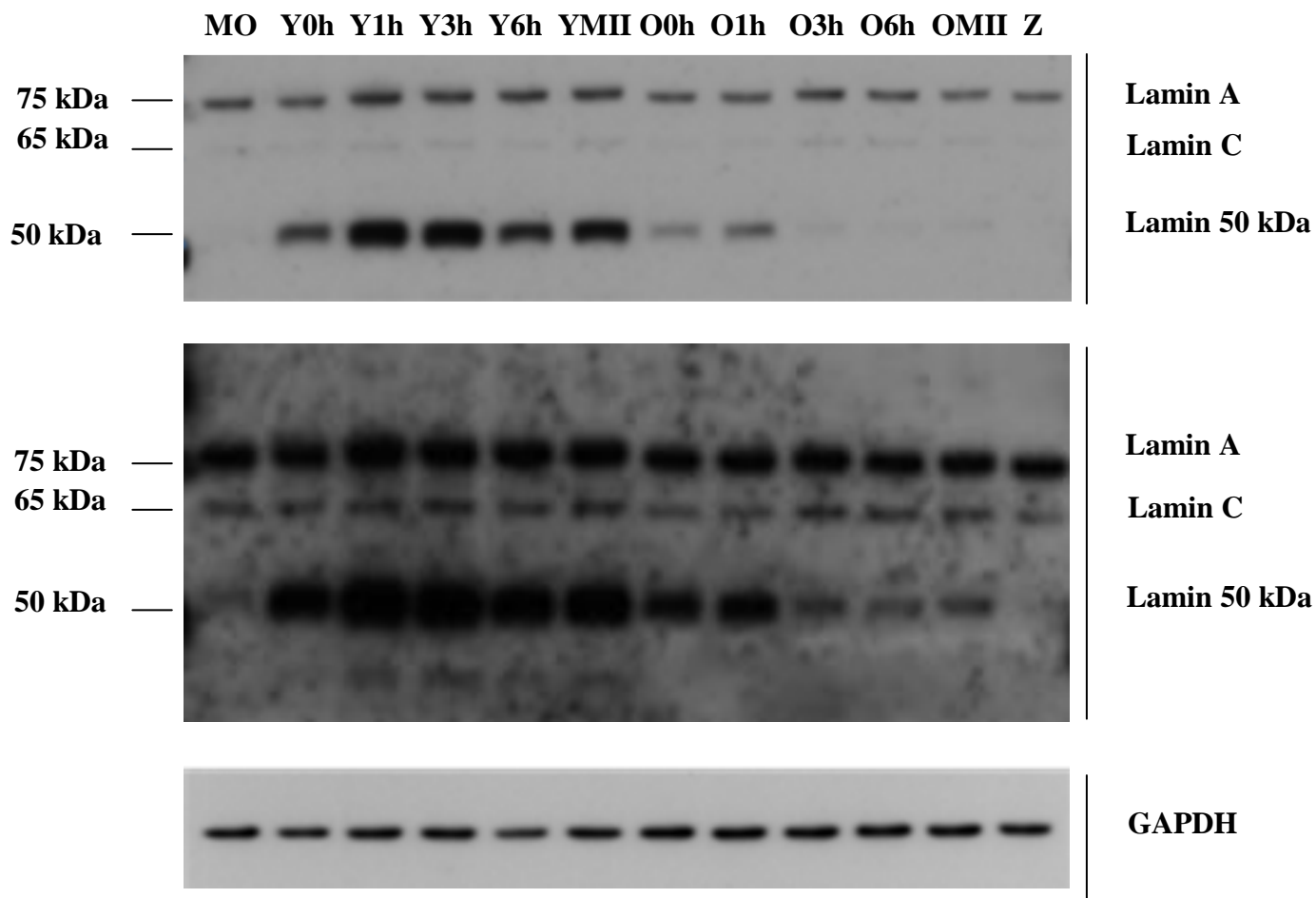
Obrázek 5 Výskyt laminu A a C v oocytech a somatických buňkách



N=15

*N* – počet oocytů v každém vzorku, *K. B. GV* – kumulární buňky oocyty ve stádiu zárodečného váčku, *K. B. MII* – kumulární buňky oocyty ve stádiu metafáze II, *GV* – oocyt ve stádiu zárodečného váčku, *MI* – oocyt ve stádiu metafáze II, *GAPDH* – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza.

**Obrázek 6 Přítomnost Laminu A a C a 50 kDa fragmentu laminu A v oocytech  
v průběhu meiotického zrání**



**N=15**

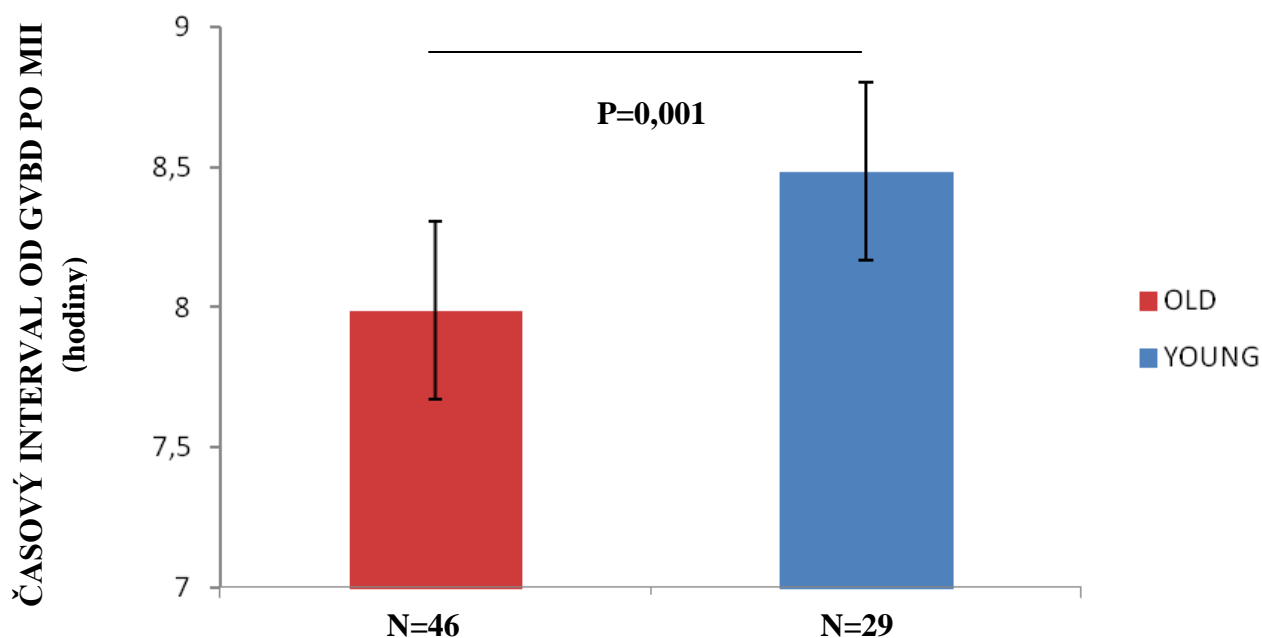
*N – počet oocytů v každém vzorku, MO – mrtvé oocyty, Y0h – oocyty mladých myší ihned po promytí od IBMX, Y1h – oocyty mladých myší 1 hodinu po promytí od IBMX, Y3h – oocyty mladých myší 3 hodiny po promytí od IBMX, Y6h – oocyty mladých myší 6 hodin po promytí od IBMX, YMII – oocyty mladých myší ve stádiu MII, O0h – oocyty starých myší ihned po promytí od IBMX, O1h – oocyty starých myší 1 hodiny po promytí od IBMX, O3h – oocyty starých myší 3 hodiny po promytí od IBMX, O6h – oocyty starých myší 6 hodin po promytí od IBMX, Z – zygoty, GAPDH – Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza.*

**Tabulka 3 Relativní dynamika meiotického zrání v oocytech starých a mladých myší od rozpadu jaderné membrány po vydělení 1. pólového tělíska**

SKUPINA	N	GVBD – MII (h) x ± SD	GVBD - MII (min) x ± SD
YO	46	8,485 ± 0,623	509,129 ± 37,390
OO	29	7,989 ± 0,643	479,311 ± 38,561

*N – počet oocytů v každé skupině, GVBD – oocyty ve stádiu rozpadu zárodečného váčku, MII – oocyty ve stádiu metafáze II, YO – oocyty mladých myší, OO – oocyty starých myší, SD – směrodatná odchylka při  $\alpha=0,05$ .*

**Graf 2 Dynamika meiotického zrání v oocytech starých a mladých myší od rozpadu jaderné membrány po vydělení 1. pólového tělíska**



*N – počet oocytů použitých v každé skupině, YOUNG – oocyty mladých myší, OLD – oocyty starých myší, SD – směrodatná odchylka, P – hladina významnosti.*

## 6. Diskuse

Po podrobném zkoumání struktury laminů z GV oocytů drápatky vodní (*Xenopus laevis*) bylo zjištěno, že se tato proteinová struktura skládá z vláken o rozměrech intermediálních filament (Aebi et al., 1986) a následně byly laminy klasifikovány jako strukturní proteiny, které patří k V. typu proteinové rodiny intermediálních filament (Fisher et al., 1986, McKeon et al., 1986). Tvoří proteinovou síťovinu a obložení nukleoplasmatické plochy vnitřní jaderné membrány (Gerace, 1986, Broers et al., 2006). Jaderná membrána a s ní spojené laminy jsou také zodpovědné za řízení jaderných funkcí, včetně genové exprese, prostřednictvím interakce s chromatinem a také se podílí na jeho organizaci (Malhas and Vaux, 2009).

Rozpad jaderné membrány a depolymerace laminových proteinů vnitřní jaderné membrány je proces nezbytný ke správnému průběhu meiotického zrání a segregaci chromozomů. Laminy jsou depolymerizovány a dělí se na produkty s relativní molekulovou hmotností ~70 kDa (Lamin A) a laminy s molekulovou hmotností ~65 kDa (Lamin C) (Gerace and Blobel, 1980, Gerace et al., 1978). Jak se ale podařilo prokázat v této práci, na rozdíl od somatických buňek, kde jsou koncentrace jak Laminu A, tak jeho izoformy Laminu C ve větší rovnováze, v oocytech se Lamin C vyskytuje jen ve velice malých koncentracích a může se jevit jako nedekovatelný. V naší studii byl však kromě těchto produktů zjištěn i laminový fragment o molekulové hmotnosti 50 kDa. Tento fragment byl přítomen ve vyšších koncentracích zejména v oocytech mladých myší. Bude proveden další výzkum pro jeho identifikaci a objasnění vzniku a úlohy během meiotického zrání.

Pro fragmentaci a depolymeraci laminů je nezbytná jejich fosforylace. Rozklad jaderných laminů je řízen fosforylací laminových podjednotek díky p34Cdc2 kináze, což způsobuje depolymerizaci laminových polymerů vyššího řádu za vzniku především monomerů, dimerů a tetramerů. Tato kináza přímo fosforyluje lamin na zbytcích, které lemují tyčovou doménu laminu (Dessev et al., 1991, Gerace and Blobel, 1980, Newport and Spann, 1987, Ottaviano and Gerace, 1985, Peter et al., 1990, Heald and McKeon, 1990). Opětovné sestavení laminů je v přímé korelaci s defosforylací těchto zbytků (Peter et al., 1990). Disociační proces laminů se zdá být postupný, což vede ke smršťování korespondujícím se zmenšováním jaderného průměru (Dessev and Goldman, 1988, Newport and Spann, 1987). Avšak v této práci bylo na myších modelech zjištěno, že existují rozdíly ve fosforylaci laminů po zahájení meiotického zrání a jejich disociaci v závislosti na stáří jedinců, jejichž oocyty byly pozorovány.

Fosforylované Laminy A / C byly v oocytech starých myší po výstupu z meiotického bloku pozorovány dříve, než v oocytech mladých jedinců. Což potvrzuje domněnku, že v oocytech starých myší dochází k rozpadu jaderné membrány po zahájení meiotického zrání dříve, než u oocytů mladých myší. Tomu nasvědčuje i rozdílná aktivita Histon H1 a MAP kináz pozorovaná u obou skupin oocytů před rozpadem jaderné membrány. Obě kinázy vykazovaly vyšší aktivitu před rozpadem jaderné membrány u oocytů starých myší, než byla aktivita těchto kináz před rozpadem jaderné membrány u mladých myší. Histon H1 kináza slouží jako biochemický ukazatel fosforylační aktivity proteinového komplexu p34Cdc2, který fosforyluje Lamin A / C (Jung et al., 1993). MAP kinázy se podílejí na přenosu signálu a také uvolňují Rb a c-fos z jejich vazby na jaderné laminy. Tyto kinázy jsou nezbytné pro iniciaci meiotického zrání a jejich aktivita po zahájení meiózy I se postupně zvyšuje až do stádia anafáze (Rodriguez et al., 2010).

Po disociaci laminových struktur jejich fosforylací a po rozpadu jaderné membrány dochází k tvorbě fyzikální bariéry, tvořenou z asociovaných Laminů A / C a dále z endoplazmatického retikula. Tyto struktury oddělují po rozpadu jaderné membrány chromatin od zbytku cytoplazmy a vytvářejí tak dvě odlišné translační oblasti oocytu. Jedna z translačních oblastí se nachází uvnitř této bariéry v těsné blízkosti chromatinu a nazývá se chromozomální translační oblast a druhá se nachází vně této bariéry v cytoplazmě a nazývá se perispindulární translační oblast. V průběhu prometafáze I pak dochází k vymizení těchto struktur (Šušor et al., 2015). V této práci se však podařilo prokázat rozdíly v průběhu tohoto procesu a lokalizaci těchto struktur u oocytů mladých a starých jedinců myší. Pomocí imunocytochemické metody byly u obou skupin myší lokalizovány Laminy A / C krátce (2 hodiny po promytí od inhibitoru zrání) po rozpadu jaderné membrány. Zatímco u oocytů mladých myší byla bariéra v tomto stádiu lokalizována, u oocytů starých myší bariéra tvořená asociovanými Laminy A/C a endoplazmatickým retikulem v tomto stádiu lokalizována nebyla. U oocytů mladých myší tvořily asociované laminy ve stádiu po NEBD a v prometafázi I většinu Laminů A/C disociovaných od jaderné membrány. U oocytů starých myší naopak tvořily v tomto stádiu většinu Laminů A/C laminy neasociované.

Tvrzení, že u oocytů starých myší dochází k rychlejšímu průběhu meiotického zrání, podporuje i výzkum Šebestová et al. 2012 zabývající se segregací chromozomů a vzniku chromozomových aberací, ve kterém bylo uveřejněno, že existuje rozdíl v časových intervalech, měřených od rozpadu jaderné membrány po segregaci chromozomů, mezi oocyty

mladých a starých myší. U oocytů starých myší byl tento interval kratší, než u mladých. Výskyt aneuploidii se zvyšoval s věkem matky, což bylo zatím potvrzeno u lidí a u myší (Hassold and Hunt, 2001). Jedním z faktorů, které přispívají k tak vysokému výskytu aneuploidii v oocytech starých matek je tvorba nezarovnaných kinetochórů a oslabení centromerické soudržnosti, vznikající v důsledku neschopnosti oocyty přemístit kohesiny při dlouhodobém pozastavení profáze I (Chiang et al., 2010; Lister et al., 2010). Redukované spojení mezi sesterskými chromatidami a nestejně dlouhé kinetochóry způsobují předčasnou segregaci chromozomů v meióze I a rychlý nástup anafáze I (Tachibana-Konwalski et al., 2010, Revenkova et al., 2010).

S tím koresponduje náš výzkum, ve kterém bylo zjištěno, že u oocytů starých myší dochází k fosforylaci a disociaci laminů, jaderné desintegraci a vydělení prvního pólového tělíska statisticky významně dříve, než u oocytů mladých myší. To může také souviset s nepřítomností bariéry asociovaných laminů u oocytů starých myší na počátku prometafáze I. Tyto bariéry oddělující chromozomy od zbytku cytoplazmy v raném stádiu meiotického zrání a jejich časné vymizení, stejně jako časná fosforylace laminů a rozpad jaderné membrány u oocytů starých myší, by také mohlo mít vliv na špatnou segregaci chromozomů a zvýšený výskyt aneuploidii. To koresponduje se studií Dernburga (2013), kde byl použit Lamin C2 exprimovaný v samčích zárodečných buňkách. Jak se ukázalo, Lamin C2 byl nezbytný pro včasné přemístění meiotických telomer. Při jeho absenci byly synapse homologních chromozomů vážně ovlivněny. To též vede k závěru, že jaderné laminy přímo přispívají k plodnosti usnadněním meiotického pohybu chromozomů.

Je tedy zřejmé, že laminy hrají důležitou roli v průběhu meiotického zrání, ať už se jedná o jejich fosforylaci a desintegraci jaderné membrány, jejich komunikaci s chromatinem, oddělení chromatinu od zbytku cytoplazmy po rozpadu jaderného obalu, nebo při správné segregaci chromozomů. Dále lze předpokládat, že u oocytů starých jedinců jsou tyto fyziologické pochody laminu urychleny, stejně jako celý průběh meiózy a to může souviset se zvýšeným výskytem aneuploidii.



## 7. Závěr

Cílem této práce bylo potvrdit hypotézu, že nerozpoznané laminové struktury po NEBD vytvářejí mechanické bariéry a jsou důležité pro frakcionaci cytoplasmy během meiotického zrání. Hypotéza byla ověřována pomocí sledování dynamiky Laminu A / C v oocytech mladých a starých myší.

V této práci se podařilo prokázat přítomnost mechanických bariér v oocytech starých a mladých myší, tvořených asociovanými Laminy A / C a endoplazmatickým retikulem, po rozpadu jaderné membrány v rané fázi meiózy I. Tyto struktury u mladých oocytů vymizí na konci prometafáze I. Zároveň bylo pomocí imunocytochemické metody prokázáno, že tyto mechanické bariéry v oocytech starých myší vymizí dříve, než je tomu u oocytů mladých myší.

Dále bylo prokázáno, že u oocytů starých myší dochází po výstupu z meiotického bloku a zahájení meiotického zrání k fosforylaci Laminu A / C dříve, než u oocytů mladých myší. Následkem rychlejší fosforylace Laminu A / C po výstupu z meiotického bloku u oocytů starých myší dochází dříve k fragmentaci a depolymeraci laminů z jaderné membrány a to následně pravděpodobně vede k rychlejší fragmentaci a rozpadu jaderné membrány díky rychlejšímu formování aktinového obalu, který asociuje s jadernou membránou a způsobuje její fragmentaci a rozpad. S tím korelují další výsledky této práce, ve kterých bylo zjištěno, že u oocytů starých myší dochází k rychlejšímu rozpadu jaderné membrány a vydělení prvního pólového tělíška, než u oocytů mladých myší.

Na základě výsledků lze uvažovat o rychlejším průběhu meiotického zrání u oocytů starých myší a o zapojení laminových a Arp2/3 F – Aktinových struktur do tohoto procesu. Rychlejší fosforylace Laminu A / C, disociace od jaderné membrány a dřívější vymizení mechanické bariéry obklopující chromatin po rozpadu jaderné membrány, stejně tak jako rychlejší formování aktinového obalu, by mohlo vypovídat o zapojení těchto struktur do rychlejšího průběhu meiotického zrání, ale také o zapojení do vzniku aneuploidií vlivem špatné segregace chromozomů.

K úplnému objasnění role laminů a rozdílů v dynamice v průběhu meiotického zrání v závislosti na věku matky je však třeba dalších experimentů.

## 8. Seznam literatury

- ❖ Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L., Gerace, L. 1986. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate filaments. *Nature*. 323. p. 560–564.
  
- ❖ Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M., Sanes, J. R. 2000. Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*. 275. p. 31986–31995.
  
- ❖ Barboro, P., D'Arrigo, C., Mormino, M., Coradeghini, R., Parodi, S., Patrone, E., Balbi, C. 2003. An intranuclear frame for chromatin compartmentalization and higher-order folding. *Journal of cellular biochemistry*. 88 (1): 113-120.
  
- ❖ Barboro, P., D'Arrigo, C., Repaci, E., Patrone, E., Balbi, C. 2010. Organization of the lamin scaffold in the internal nuclear matrix of normal and transformed hepatocytes. *Experimental cell research*. 316 (6): 992-1001.
  
- ❖ Barrowman, J., Hamblet, C., Kane, M. S., Michaelis, S. 2012. Requirements for Efficient Proteolytic Cleavage of Prelamin A by ZMPSTE24. *Plos One*. 7 (2): 32120.
  
- ❖ Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R., Ellenberg, J. 2002. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*. 108: 83–96.
  
- ❖ Beck LA, Hosick TJ, and Sinensky M. Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol* 110: 1489–1499, 1990.
  
- ❖ Belmont, A. S., Zhai, Y., Thilenius, A. 1993. Lamin-B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and Electron-microscopy TOMOGRAPHY. *Journal of Cell biology*. 123 ( 6): 1671-1685.
  
- ❖ Benavente, R., Krohne, G., Franke, W. W. 1985. Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell*. 41: 177–190.

- ❖ Bergo, M.O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E. R., Van Bruggen, N., Carano, R. A., Michaelis, S., Griffey, S. M., Young, S. G. 2002. Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 99: 13049–13054.
  
- ❖ Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S., Falaschi, A. 1992. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Molecular Cell Biology.* 12: 3499–3506.
  
- ❖ Bloom, S., Lockard, V. G., Bloom, M. 1996. Intermediate filament-mediated stretch-induced changes in chromatin: a hypothesis for growth initiation in cardiac myocytes. *Journal of Molecular Cell Cardiology.* 28: 2123–2127.
  
- ❖ Bridger, J. M., Kill, I., O'Farrell, M., Hutchison, C. J. 1993. Internal lamin structure within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *Journal of Cell Science.* 104: 297–306.
  
- ❖ Brodie, C., Blumberg, P. M. 2003. Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta. *Apoptosis.* 8: 19–27,2003.
  
- ❖ Broers, J. L., Bronnenberg, N. M., Kuijpers, H. J., Schutte, B., Hutchison, C. J., Ramaekers, F. C. 2002. Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *European Journal of Cell Biology.* 81: 677–691.
  
- ❖ Broers, J. L., Hutchison, C. J., Ramaekers, F. C. 2004. Laminopathies. *Journal of Pathology.* 204: 478–488.
  
- ❖ Broers, J. L., Kuijpers, H. J., Ostlund, C., Worman, H. J., Endert, J., Ramaekers, F. C. 2005. Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Experimental Cell Research.* 304:582–592.

- ❖ Broers, J. L., Machiels, B. M., Kuijpers, H. J., Smedts, F., van den Kieboom, R., Raymond, Y., Ramaekers, F. C. 1997. A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochemical Cell Biology*. 107: 505–517.
  
- ❖ Broers, J. L., Ramaekers, F. C. 2004. Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly. *Symposia of the Society for Experimental Biology journal*. 56: 177–192.
  
- ❖ Broers, J. L., Raymond, Y., Rot, M. K., Kuijpers, H., Wagenaar, S. S., Ramaekers, F. C. 1993. Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *American Journal of Pathology*. 143: 211–220.
  
- ❖ Broers, J. L., Machiels, B. M., van Eys, G. J. J., Kuijpers, H. J. H., Manders, E. M. M., van Driel, R., Ramaekers, F. C. S. 1999. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *Journal of Cell Sciences*. 112: 3463–3475.
  
- ❖ Brown, C. A., Lanning, R. W., McKinney, K. Q., Salvino, A. R., Cherniske, E., Crowe, C. A., Darras, B. T., Gominak, S., Greenberg, C. R., Grosmann, C., Heydemann, P., Mendell, J. R., Pober, B. R., Sasaki, T., Shapiro, F., Simpson, D. A., Suchowersky, O., Spence, J. E. 2001. Novel and recurrent mutations in lamin A/C in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *American Journal of Medical Genetics*. 102: 359–367.
  
- ❖ Buendia, B., Santa-Maria, A., Courvalin, J. C. 1999. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *Journal of Cell Science*. 112: 1743–1753.
  
- ❖ Burke, B., Stewart, C. L. 2002. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nature Review Molecular Cell Biology*. 3: 575–585.
  
- ❖ Carlberg, C., Molnár, F. 2013. *Mechanisms of Gene Regulation*. Springer Science and Business Media. London. ISBN: 978-94-007-7905-1.

- ❖ Chiang, S. Y., Coffinier, C., S. Y., Nobumori, C., Tu, Y., Farber, E. A., Toth, J., Fong, G. L., Young, S. G. Abnormal development of the cerebral cortex and cerebellum in the setting of lamin B2 deficiency. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 107 (11): 5076 – 5081.
  
- ❖ Chaudhary, N., Courvalin, J. C. 1993. Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Journal of Cell Biology*. 122: 295–306.
  
- ❖ Clements, L., Manilal, S., Love, D. R., Morris, G. E. 2000. Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267: 709–714.
  
- ❖ Coffinier, C., Jung, H. J., Nobumori, C., Chang, S., Tu, Y. P., Barnes, R. H., Yoshinaga, Y., de Jong, P. J., Vergnes, L., Reue, K., Fong, L. G., Young, S. G. 2011. Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons. *22 (23): 4683-4693*.
  
- ❖ Collas, P., Thompson, L., Fields, A. P., Poccia, D. L., Courvalin, J. C. 1997. Protein kinase C-mediated interphase lamin B phosphorylation and solubilization. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 21274–21280.
  
- ❖ Conway, J. F., Parry, D. A. 1990. Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 12: 328–334.
  
- ❖ Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P. D., Hodzic, D. 2006. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *Journal of Cell Biology*. 172: 41–53.
  
- ❖ Cross, T., Griffiths, G., Deacon, E., Sallis, R., Gough, M., Watters, D., Lord, J. M. 2000. PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene*. 19: 2331–2337.

- ❖ Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., Ellenberg, J. 2001. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 154: 71–84.
  
- ❖ Dagenais, A., Lemyre, A., Biborhardy, V. 1990. Differential transport and integration into the nuclear lamina for Lamin-A, Lamin-B, and Lamin-C. *Biochemistry and Cell biology – Biochimie et Biologie Cellulaire*. 68 (5): 827-831
  
- ❖ Dechat, T., Gajewski, A., Korbei, B., Gerlich, D., Daigle, N., Haraguchi, T., Furukawa, K., Ellenberg, J., Foisner, R. 2004. LAP2alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *Journal of Cell Science*. 117: 6117–6128.
  
- ❖ Dechat, T., Vlcek, S., Foisner, R. Lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *Journal of Structural Biology*. 129: 335–345.
  
- ❖ Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., Goldman, R. D. 2008. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes and Development*. 22 (7): 832-853 .
  
- ❖ Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., Goldman, R. D. 2010. Nuclear Lamins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2 (11): 547.
  
- ❖ Delbarre, E., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Gaillard, C., Courvalin, J. C., Buendia, B. 2006. The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Human Molecular Genetics*. 15: 1113–1122.
  
- ❖ Dernburg, A. F. 2013. Pushing the nuclear envelope into meiosis. *Genome biology*. 14 (3): 110.

- ❖ Dessev, G., Iovchev, A., Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D., Goldman, R. 1991. A complex containing p34Cdc2 and Cyclin – B phosphorylates the nuclear lamin and disassembled nuclei of clam oocytes *in vitro*. *Journal of Cell Biology*. 112 (4): 523-533.
  
- ❖ Dessev, G., Goldman, R. 1988. Meiotic breakdown of nuclear – envelope in oocytes of *Spisula-Solidissima* involves phosphorylation and release of nuclear lamin. *Developmental Biology*. 130 (2): 543-550.
  
- ❖ Dhe-Paganon, S., Werner, E. D., Chi, Y. I., Shoelson, S. E. 2002. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 17381–17384.
  
- ❖ Dimitrova, D. S., Berezney, R. 2002. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *Journal of Cell Sciences*. 115: 4037–4051.
  
- ❖ Dreuillet, C., Tillit, J., Kress, M., Ernoult-Lange, M. 2002. In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Research*. 30: 4634–4642.
  
- ❖ Drummond, S., Ferrigno, P., Lyon, C., Murphy, J., Goldberg, M., Allen, T., Smythe, C., Hutchison, C. J. 1999. Temporal differences in the appearance of NEP-B78 and an LBR-like protein during *Xenopus* nuclear envelope reassembly reflect the ordered recruitment of functionally discrete vesicle types. *Journal of Cell Biology*. 144 (2): 225-240.
  
- ❖ Duband-Goulet, I., Courvalin, J. C., Buendia, B. 1998. LBR, a chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *Journal of Cell Sciences*. 111: 1441–145.
  
- ❖ Dwyer, N., Blobel, G. 1976. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *Journal of Cell Biology*. 70: 581–591.

- ❖ Dyer, J. A., Lane, B. E., Hutchison, C. J. 1999. Investigations of the pathway of incorporation and function of lamin A in the nuclear lamina. *Microscopy Research and Technique*. 45: 1–12.
  
- ❖ Eckersley-Maslin, M. A., Bergmann, J. H., Lazar, Z., Spector, D. L. 2013. Lamin A/C is expressed in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Nucleus – Austin*. 4 (1): 53–60.
  
- ❖ Ellis, D. J., Jenkins, H., Whitfield, W. G., Hutchison, C. J. 1997. GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *Journal of Cell Sciences*. 110: 2507–2518.
  
- ❖ Farnsworth, C. C., Wolda, S. L., Gelb, M. H., Glomset, J. A. 1989. Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry*. 264: 20422–20429.
  
- ❖ Fisher, D. Z., Chaudhary, N., Blobel, G. 1986. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 83: 6450–6454.
  
- ❖ Foisner, R. 1997. Dynamic organisation of intermediate filaments and associated proteins during the cell cycle. *Bioessays*. 19: 297–305.
  
- ❖ Foisner, R., Gerace, L. 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell*. 73: 1267–1279.
  
- ❖ Fong, L. G., Ng, J. K., Lammerding, J., Vickers, T. A., Meta, M., Cote, N., Gavino, B., Qiao, X., Chang, S. Y., Young, S. R., Yang, S. H., Stewart, C. L., Lee, R. T., Bennett, C. F., Berge, M. O., Young, S. G. 2006. Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *Journal of Clinical Investigation*. 116: 743–752.



- ❖ Foster, H. A., Stokes, P., Forsey, K., Leese, H. J., Bridger, J. M. 2006. Lamin A and C are present in the nuclei of early porcine embryos, with Lamin A being distributed in large intranuclear foci. *Chromosome research*. 15(2): 163 – 174.
  
- ❖ Frangioni, J. V., Neel, B. G. 1993. Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal. *Journal of Cell Sciences*. 105: 481 – 488.
  
- ❖ Fricker, M., Hollinshead, M., White, N., Vaux, D. 1997. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane bound invaginations of the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology*. 136: 531–544.
  
- ❖ Furukawa, K. 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *Journal of Cell Sciences*. 112: 2485–2492.
  
- ❖ Furukawa, K., Hotta, Y. 1993. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo Journal*. 12: 97–106.
  
- ❖ Furukawa, K., Inagaki, H., Hotta, Y. 1994. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Experimental Cell Research*. 212: 426–430.
  
- ❖ Furukawa, K., Kondo, T. 1998. Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. *European Journal of Biochemistry*. 251: 729–733.
  
- ❖ Gant, T. M., Wilson, K. L. 1997. Effect of LAP2 polypeptides on nuclear formation and fiction *in vitro*. *Molecular biology of the cell*. 8: 605 – 605.

- ❖ Gant, T. M., Harris, C. A., Wilson, K. L. 1999. Roles of LAP2 proteins in nuclear assembly and DNA replication: truncated LAP2beta proteins alter lamina assembly, envelope formation, nuclear size, and DNA replication efficiency in *Xenopus laevis* extracts. *Journal of Cell Biology*. 144: 1083–1096.
  
- ❖ Georgatos, S. D., Pyrpasopoulou, A., Theodoropoulos, P. A. 1997. Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *Journal of Cell Sciences*. 110: 2129–2140.
  
- ❖ Gerace, L., Blobel, G. 1980. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277–287.
  
- ❖ Gerace, L., Blobel, G. 1982. Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*. 46: 967–978.
  
- ❖ Gerace, L., Blobel, G. 1990. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell*. 19: 277–287.
  
- ❖ Gerace, L., Blum, A., Blobel, G. 1978. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *Journal of Cell Biology*. 79: 546–566.
  
- ❖ Gerace, L. 1986. Nuclear lamina and organization of nuclear architecture. *Trends in Biochemical Sciences*. 11 (11): 443-446.
  
- ❖ Gerace, L., Burke, B. 1988. Functional organization of the nuclear envelope. *Annual Review of Cell and developmental Biology*. 4: 335–374.
  
- ❖ Gieffers, C., Krohne, G. 1991. In vitro reconstitution of recombinant lamin A and lamin A mutant lacking the carboxy-terminal tail. *European Journal of Cell Biology*. 55: 191–199.

- ❖ Glass, C. A., Glass, J. R., Taniura, H., Hasel, K. W., Blevitt, J. M., Gerace, L. 1993. The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *Embo Journal*. 12: 4413–4424, 1993.
  
- ❖ Glomset, J. A., Gelb, M. H., Farnsworth, C. C. 1990. Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends in Biochemical Sciences*. 15: 139–142.
  
- ❖ Goldberg, M. W., Allen, T. D. 1993. The Nuclear Pore Complex and Lamina: Three-dimensional Structures and Interactions Determined by Field Emission In-lens Scanning Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology*. 257 (4): 848 – 865.
  
- ❖ Goldberg, M., Lu, H. H., Stuurman, N., Ashery-Padan, R., Weiss, A. M., Yu, J., Bhattacharyya, D., Fisher, P. A., Gruenbaum, Y., Wolfner, M. F. 1998. Interaction among *Drosophila* nuclear envelope proteins lamin, otefin, and YA. *Molecular and Cellular biology*. 18 (7): 4315 – 4323.
  
- ❖ Goldberg, M., Harel, A., Brandeis, M., Rechsteiner, T., Richmond, T. J., Weiss, A. M., Gruenbaum, Y. 1999. The tail domain of lamin Dm0 binds histones H2A and H2B. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 96: 2852–2857.
  
- ❖ Goldberg, M. 2004. Import and export at the nuclear envelope. *Symposia of the Society for Experimental Biology Journal*. 115–133.
  
- ❖ Goldman, A. E., Moir, R. D., Montaglowy, M., Stewart, M., Goldman, R. D. 1992. Pathway of incorporation of microinjected Lamin – A into the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology*. 119 (4): 725 – 735.
  
- ❖ Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., Steinert, P. M. 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *Journal of Cell Biology*. 134 (4): 971.

- ❖ Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., Collins, F. S. 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 101: 8963–8968.
  
- ❖ Gotzmann, J., Vlcek, S., Foisner, R. 2000. Caspase-mediated cleavage of the chromosome-binding domain of lamina-associated polypeptide 2 alpha. *Journal of Cell Sciences*. 113: 3769–3780.
  
- ❖ Gruenbaum, Y., Lee, K. K., Liu, J., Cohen, M., Wilson, K. L. 2002. The expression, lamin-dependent localization and RNAi depletion phenotype for emerin in *C. elegans*. *Journal of Cell Sciences*. 115: 923–929.
  
- ❖ Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Wilson, K. L. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 21–31.
  
- ❖ Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y., Hiraoka, Y. 2000. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *Journal of Cell Sciences*. 113: 779–794.
  
- ❖ Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K. K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K. L., Hiraoka, Y. 2001: BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *Journal of Cell Sciences*. 114: 4575–4585.
  
- ❖ Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., Weber, K. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *Journal of Cell Sciences*. 114: 4557–4565.
  
- ❖ Hassold, T., Hunt, P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature reviews Genetics*. 2: 280 – 291.

- ❖ Hawryluk-Gara, L. A., Shibuya, E. K., Wozniak, R. W. 2005. Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex. *Molecular Biology of the Cell*. 16: 2382–2394.
  
- ❖ Heald, R., McKeon, F. 1990. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61: 579–589.
  
- ❖ Heitlinger, E., Peter, M., Haner, M., Lustig, A., Aebi, U., Nigg, E. A. 1991. Expression of chicken lamin B2 in *Escherichia coli*: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. *Journal of Cell Biology*. 113: 485–495.
  
- ❖ Heitlinger, E., Peter, M., Lustig, A., Villiger, W., Nigg, E. A., Aebi, U. 1992. The role of the head and tail domain in lamin structure and assembly: analysis of bacterially expressed chicken lamin A and truncated B2 lamins. *Journal of Structural Biology*. 108: 74–89.
  
- ❖ Herrmann, H., Aebi, U. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*. 73: 749–789.
  
- ❖ Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., Aebi, U. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*. 8 (7): 562–573.
  
- ❖ Houben, F., Willems, C. H. M. P., Declercq, I. L. J., Hochstenbach, K., Kamps, M. A., Snoeck, L. H. E. H., Ramaekers, F. C. S., Broers, J. L. V. 2009. Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. *Molecular Cell Research*. 1793 (2): 312 – 324.
  
- ❖ Hozák, P., Sasseville, M. J., Raymond, Y., Cook, P. R. 1995. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Sciences*. 108: 635–644.

- ❖ Hutchison, C. J., Alvarez-Reyes, M., Vaughan, O. A. 2001. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *Journal of Cell Sciences*. 114: 9–19.
  
- ❖ Hutchison, C. J. 2001. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nature reviews of Molecular Biology*. 3: 848–858.
  
- ❖ Hutchison, C. J. 2002. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nature Review Molecular Cell Biology*. 3: 848–858.
  
- ❖ Hyttel, P., Vajta, G., Callesen, H. 2000. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: Ultrastructural consequences. *Molecular reproduction and Development*. 56 (1): 80 – 88.
  
- ❖ Ivorra, C., Kubicek, M., Gonzalez, J. M., Sanz-Gonzalez, S. M., Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J. E., Burke, B., Andres, V. 2006. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes and Development*. 20: 307–320.
  
- ❖ Izumi, M., Vaughan, O. A., Hutchison, C. J., Gilbert, D. M. 2000. Head and/or CaaX domain deletions of lamin proteins disrupt preformed lamin A and C but not lamin B structure in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*. 11:4323–4337.
  
- ❖ Jackson, D. A. 2004. Regulating gene expression in mammalian cells: how nuclear architecture influences mRNA synthesis and export to the cytoplasm. *Symposia of the Society for Experimental Biology journal*.135–155.
  
- ❖ Jagatheesan, G., Thanumalayan, S., Muralikrishna, B., Rangaraj, N., Karande, A. A., Parnaik, V. K. 1999. Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. *Journal of Cell Sciences*. 112: 4651–4661.
  
- ❖ Jenkins, H., Holman, T., Lyon, C., Lane, B., Stick, R., Hutchison, C. 1993. Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. *Journal of Cell Sciences*. 106: 275–285.

- ❖ Johnson, B. R., Nitta, R. T., Frock, R. L., Mounkes, L., Barbie, D. A., Stewart, C. L., Harlow, E., Kennedy, B. K. 2004. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 101: 9677–9682.
  
- ❖ Johnson, N., Krebs, M., Boudreau, R., Giorgi, G., LeGros, M., Larabell, C. 2003. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell differentiation. *Differentiation*. 71: 414–424.
  
- ❖ Jung, T., Moor, R. M., Fulka, J. Jr. 1993. Kinetics of MPF and histone H1 kinase activity differ during the G2- to M-phase transition in mouse oocytes. Department of Molecular Embryology, Institute of Animal Physiology and Genetics Research, Cambridge, United Kingdom. *The International Journal of Developmental Biology*. 37 (4): 595-600.
  
- ❖ Karabinova, P., Kubelka, M., Susor, A. 2011. Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell and Tissue Research*. 346 (1): 1 – 9.
  
- ❖ Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Classon, M., Dyson, N., Harlow, E. 2000. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes and Development*. 14: 2855–2868.
  
- ❖ Kilic, F., Salas-Marco, J., Garland, J., Sinensky, M. 1997. Regulation of prelamin A endoprotease activity by prelamin A. *FEBS Letters*. 414: 65–68
  
- ❖ Kim, Y., Sharov, A. A., McDole, K., Cheng, M., Hao, H., Fan, C., Gaiano, N., Ko., M. S. H., Zheng, Y. 2011. Mouse B-Type Lamins Are Required for Proper Organogenesis But Not by Embryonic Stem Cells.
  
- ❖ Kim, Y., Zheng, X., Zheng, Y. 2013. Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells lacking all lamins. *Cell research*. 23:1420–1423
  
- ❖ Kiseleva, E., Allen, T. D., Rutherford, S., Bucci, M., Wentz, S. R., Goldberg, M. W. 2004. Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *Journal of Structural Biology*. 145: 272–288.

- ❖ Korenjak, M., Brehm, A. 2005. E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Current Opinion in Genetics and Development*. 15: 520–52.
  
- ❖ Krimm, I., Ostlund, C., Gilquin, B., Couprie, J., Hossenlopp, P., Mornon, J. P., Bonne, G., Courvalin, J. C., Worman, H. J., Zinn-Justin, S. 2002. The Ig-like structure of the C-terminal domain of A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure*. 10: 811–823.
  
- ❖ Krohne, G., Waizenegger, I., Hoger, T. H. 1989. The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology*. 109: 2003–2011.
  
- ❖ Kusch, T. 2015. Brca2-Pds5 complexes mobilize persistent meiotic recombination sites to the nuclear envelope. *Journal of Cell Sciences*. 128 (4): 717-27.
  
- ❖ Laronne, A., Rotkopf, S., Hellman, A., Gruenbaum, Y., Porter, A. C., Brandeis, M. 2003. Synchronization of interphase events depends neither on mitosis nor on cdk1. *Molecular Biology of the Cell*. 14: 3730–3740.
  
- ❖ Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H., Girard, D. 2005. Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leukemia Research*. 29: 1443–1453.
  
- ❖ Lee, K. K., Haraguchi, T., Lee, R. S., Koujin, T., Hiraoka, Y., Wilson, K. L. 2001. Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *Journal of Cell Sciences*. 114: 4567–4573.
  
- ❖ Lee, K. K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K. L., Gruenbaum, Y. 2002. Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 892–901.



- ❖ Legartova, S., Stixova, L., Laur, O., Kozubek, S., Sehnalová, P., Bártová, E. 2014. Nuclear structures surrounding internal lamin invagination. *Cellular Biochemistry*. 115 (3): 476 – 487.
  
- ❖ Lehner, C. F., Stick, R., Eppenberger, H. M., Nigg, E. A. 1987. Differential expression of nuclear lamin proteins during chick development. *Journal of Cell Biology*. 105: 577–587.
  
- Lenart, P., Ellenberg, J. 2003. Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. *Current opinion in Cell Biology*. 15 (1): 88 – 95.
  
- ❖ Lenz-Bohme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H., Schmitt, B. 1997. Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *Journal of Cell Biology*. 137: 1001–1016.
  
- ❖ Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V. C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A. A., Karakesisoglou, I. 2005. Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Molecular Biology of the Cell* 16: 3411–3424.
  
- ❖ Lin, F., Blake, D. L., Callebaut, I., Skerjanc, I. S., Holmer, L., McBurney, M. W., Paulin-Levasseur, M., Worman, H. J. 2000. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 4840–4847.
  
- ❖ Lin, F., Worman, H. J. 1995. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*. 27: 230–236.
  
- ❖ Lin, F., Worman, H. J. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 16321–16326.

- ❖ Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P. O., Zhao, K. 2001. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*. 106: 309–318.
  
- ❖ Lloyd, D. J., Trembath, R. C., Shackleton, S. 2002. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Human Molecular Genetics*. 11: 769–777.
  
- ❖ Loewinger, L., McKeon, F. 1988. Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO Journal*. 7: 2301–2309.
  
- ❖ Lopez-Soler, R. I., Moir, R. D., Spann, T. P., Stick, R., Goldman, R. D. 2001. A role for nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Biology*. 154: 61–70.
  
- ❖ Lussi, Y. C., Hugia, I., Laurell, E., Kutay, U., Fahrenkrog, B. The nucleoporin Nup88 is interacting with nuclear lamin A. *Molecular Biology of the Cell*. 22 (7): 1080 – 1090.
  
- ❖ Lutz, R. L., Trujillo, M. A., Denham, K. S., Wenger, L., Sinensky, M. 1992. Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*. 89: 3000–3004.
  
- ❖ Machiels, B. M., Zorenc, A. H. G., Endert, J. M., Kuijpers, H. J. H., van Eys, G. J. J. M., Ramaekers, F. C. S., Broers, J. L. V. 1996. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 9249–9253.
  
- ❖ Malone, C. J., Fixsen, W. D., Horvitz, H. R., Han, M. 1999. UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development*. 126: 3171–3181.
  
- ❖ Malone, C. J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M. C., Campbell, J. M., Ahringer, J., White, J. G. 2003. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell*. 115:825–836.

- ❖ Malhas, A. N., Vaux, D. J. 2011. The nuclear envelope and its involvement in cellular stress responses. *Biochemical Society Transactions*. 39: 1795 – 1798.
  
- ❖ Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S., Lee, W. H. 1994. The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 91: 418–422.
  
- ❖ Mansharamani, M., Wilson, K. L. 2005. Direct binding of nuclear membrane protein MAN1 to emerin in vitro and two modes of binding to barrier-to-autointegration factor. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 13863–13870.
  
- ❖ Margalit, A., Vlcek, S., Gruenbaum, Y., Foisner, R. 2005. Breaking and making of the nuclear envelope. *Journal of Cell Biochemistry*. 95: 454–465.
  
- ❖ Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R. A., Hutchison, C. J. 2002. Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 4401–4413.
  
- ❖ Martins, S., Eikvar, S., Furukawa, K., Collas, P. 2003. HA95 and LAP2 beta mediate a novel chromatin-nuclear envelope interaction implicated in initiation of DNA replication. *Journal of Cell Biology*. 160: 177–188.
  
- ❖ McClintock, D., Gordon, L. B., Djabali, K. 2006. Hutchinson-Gilford progeria mutant lamin A primarily targets human vascular cells as detected by an anti-Lamin A G608G antibody. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 103: 2154–2159.
  
- ❖ McKeon, F. 1991. Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell-cycle-regulated dynamics. *Current Opinion in the Cell Biology*. 3: 82–86.
  
- ❖ McKeon, F. D., Kirschner, M. W., Caput, D. 1986. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*. 319: 463–468.

- ❖ McNamara, L. E., Burchmore, R., Riehle, M. O., Herzyk, P., Biggs, M. J. P., Wilkinson, C. D. W., Curtis, A. S. G., Dalby, M. J. 2012. The role of microtopography in cellular mechanotransduction. *33* (10): 2835 – 2847.
  
- ❖ Meier, J., Campbell, K. H. S., Ford, C. C., Stick, R., Hutchison, C. J. 1991. The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Journal of Cell Sciences*. 98: 271–279.
  
- ❖ Mical, T. I., Monteiro, M. J. 1998. The role of sequences unique to nuclear intermediate filaments in the targeting and assembly of human lamin B: evidence for lack of interaction of lamin B with its putative receptor. *Journal of Cell Sciences*. 111: 3471–3485.
  
- ❖ Mislow, J., Holaska, J., Kim, M., Lee, K., Segura-Totten, M., Wilson, K., McNally, E. 2002. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Letters*. 525: 135.
  
- ❖ Mitnacht, S., Weinberg, R. A. 1991. G<sub>1</sub>/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell*. 65: 381–393.
  
- ❖ Moir, R. D., Donaldson, A. D., Stewart, M. 1991. Expression in *Escherichia coli* of human lamins A and C: influence of head and tail domains on assembly properties and paracrystal formation. *Journal of Cell Sciences*. 99: 363–372.
  
- ❖ Moir, R. D., Montag-Lowy, M., Goldman, R. D. 1994. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *Journal of Cell Biology*. 125: 1201–1212.
  
- ❖ Moir, R. D., Yoon, M., Khuon, S., Goldman, R. D. 2000. Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *Journal of Cell Biology*. 151: 1155–1168.
  
- ❖ Mori, M., Somogyi, K., Kondo, H., Monnier, N., Falk, H.J., Machado, P., Bathe, M., Nedelec, F., and Lenart, P. (2014). An Arp2/3 nucleated F-actin shell fragments

nuclear membranes at nuclear envelope breakdown in meiosis of starfish oocytes. *Current Biology*. 16th issue.

- ❖ Muchir, A., Van Engelen, B. G., Lammens, M., Mislou, J. M., McNally, E., Schwartz, K., Bonne, G. 2003. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Experimental Cell Research*. 291: 352–362.
  
- ❖ Muralikrishna, B., Dhawan, J., Rangaraj, N., Parnaik, V. K. 2001. Distinct changes in intranuclear lamin A/C organization during myoblast differentiation. *Journal of Cell Sciences*. 114: 4001–4011.
  
- ❖ Nagano, A., Arahata, K. 2000. Nuclear envelope proteins and associated diseases. *Current opinion in Neurology*. 13 (5): 533 – 539.
  

Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Lida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K., Sagata, N. 2000. Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes and Development*. 14: 328 – 338.

  
- ❖ Nalepa, G., Harper, J. W. 2004. Visualization of a highly organized intranuclear network of filaments in living mammalian cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 59: 94–108.
  
- ❖ Nebreda, A. R., Ferby, I. 2000. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current opinion in Cell Biology*. 12 (6): 666 – 675.
  
- ❖ Newport, J. W., Forbes, D. J. 1987. The nucleus: structure, function, and dynamics. *Annual Reviews of Biochemistry*. 56:535–565.
  
- ❖ Nigg, E. A. 1992. Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Seminars in Cell Biology*. 3: 245–253.

- ❖ Nikolova, V., Leimena, C., McMahon, A. C., Tan, J. C., Chandar, S., Jogia, D., Kesteven, S. H., Michalicek, J., Otway, R., Verheyen, F., Rainer, S., Stewart, C. L., Martin, D., Feneley, M. P., Fatkin, D. 2004. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*. 113: 357–369.
  
- ❖ North, A. C., Steinert, P. M., Parry, D. A. 1994. Coiled-coil stutter and link segments in keratin and other intermediate filament molecules: a computer modeling study. *Proteins*. 20: 174–184.
  
- ❖ Oberhammer, F., Fritsch, G., Schmied, M., Pavelka, M., Printz, D., Purchio, T., Lassmann, H., Schulte-Hermann, R. 1993. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *Journal of Cell Sciences*. 104: 317–326.
  
- ❖ Ottaviano, Y., Gerace, L. 1985. Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 260: 624–632.
  
- ❖ Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y., Sakiyama, S. 1994. Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene*. 9: 2649–2653.
  
- ❖ Padmakumar, V. C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A. A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I., Korenbaum, E. 2004. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Experimental Cell Research*. 295: 330–339.
  
- ❖ Padmakumar, V. C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A. A., Gotzmann, J., Foisner, R., Karakesisoglou, I. 2005. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *Journal of Cell Sciences*. 118: 3419–3430.

- ❖ Pappas, G. D. 1956. The fine structure of the nuclear envelope of *Amoeba proteus*. *Cytology equipment and Supplies*. 431–434.
  
- ❖ Park, R., Baines, J. D. 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *Journal of Virology*. 80: 494–504.
  
- ❖ Parry, D. A. D., Steinert, P. M. 1995. *Intermediate Filament Structure*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
  
- ❖ Patterson, K., Molofsky, A. B., Robinson, C., Acosta, S., Cater, C., Fischer, J. A. 2004. The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Molecular Biology of the Cell*. 15: 600–610.
  
- ❖ Pendas, A. M., Zhou, Z., Cadinanos, J., Freije, J. M., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodriguez, F., Tryggvason, K., Lopez-Otin, C. 2002. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Natural Genetics*. 31: 94–99.
  
- ❖ Peter, M., Heitlinger, E., Haner, M., Aebi, U., Nigg, E. A. 1991. Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO Journal*. 10: 1535–1544.
  
- ❖ Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C., Nigg, E. A. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by *cdc2* kinase. *Cell*. 61: 591–602.
  
- ❖ Philimonenko, A. A., Hodny, Z., Jackson, D. A., Hozak, P. 2006. The microarchitecture of DNA replication domains. *Histochemistry and Cell Biology*. 125: 103–117.

- ❖ Prufert, K., Vogel, A., Krohne, G. 2004. The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *Journal of Cell Sciences*. 117: 6105–6116.
  
- ❖ Quinlan, R. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., Achtstatter, T., Moll, R., Jorcano, J. L., Magin, T. M., Franke, W. W. 1985. Patterns of expression and organization of cyokeratin intermediate filaments. *Annals of the NY Academy of Sciences*. 455: 282–306.
  
- ❖ Rao, L., Perez, D., White, E. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *Journal of Cell Biology*. 135: 1441–1455.
  
- ❖ Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vanderwaal, R. P., Feng, Z., Biehl, K. J., Gonzalez-Suarez, I., Morgado-Palacin, L., Shi, W., Sage, J., Roti-Roti, J. L., Stewart, C. L., Zhang, J., Gonzalo, S. 2011. A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair. *Cell Cycle*. 10:2549–2560.
  
- ❖ Revenkova, E., Herrmann, K., Adelfalk, C., Jessberger, R. 2010. Oocyte Cohesin Expression Restricted to Predictyate Stages Provides Full Fertility and Prevents Aneuploidy. *Current Biology*. 20 (17): 1529 – 1533.
  
- ❖ Ribbeck, K., Gorlich, D. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO Journal*. 20 (6): 1320 – 1330.
  
- ❖ Rodríguez, J., Calvo, F., González, J. M., Casar, B., Andrés, V., Crespo, P. 2010. ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma–lamin A complexes. *Madrid.JCB*. 191: 5 967-979.
  
- ❖ Röber, R. A., Weber, K., Osborn, M. 1989. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development*. 105: 365–378.



- ❖ Sakaki, M., Koike, H., Takahashi, N., Sasagawa, N., Tomioka, S., Arahata, K., Ishiura, S. 2001. Interaction between emerin and nuclear lamins. *Journal of Biochemistry*. 129: 321–327.
  
- ❖ Satelli, A., Li, S. H. 2011. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy or vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell molecular Life Scientific*. 68 (18): 3033 – 3046.
  
- ❖ Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., Gerace, L. 2003. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science*. 301: 1380–1382.
  
- ❖ Schirmer, E. C., Gerace, L. 2004. The stability of the nuclear lamina polymer changes with the composition of lamin subtypes according to their individual binding strengths. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 42811–42817.
  
- ❖ Schirmer, E. C., Guan, T., Gerace, L. 2001. Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *Journal of Cell Biology*. 153: 479–489.
  
- ❖ Sebestova, J., Danylevska, A., Dobrucka, L., Kubelka, M., Anger, M. 2012. Lack of response to unaligned chromosomes in mammalian female gametes. *Cell Cycle*. 11 (16): 3011-3018.
  
- ❖ Shimi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Wilson, K. L., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. 2004. Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *Journal of the Structural Biology*. 147:31–41.
  
- ❖ Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S. I., Pack, C. G., Solovei, I., Goldman, A. E., Adam, S. A., Shumaker, D. K., Kinjo, M., Cremer, T., Goldman, R. D. 2008. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes and Development*. 22 (24): 3409 – 3421.

- ❖ Shumaker, D. K., Lee, K. K., Tanhehco, Y. C., Craigie, R., Wilson, K. L. 2001. LAP2 binds to BAF.DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO Journal*. 20: 1754–1764.
  
- ❖ Shumaker, D. K., Lopez-Soler, R. I., Adam, S. A., Herrmann, H., Moir, R. D., Spann, T. P., Goldman, R. D. 2006. Functions and dysfunctions of the nuclear lamin Ig-fold domain in nuclear assembly, growth, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 102: 15494–15499.
  
- ❖ Simon DN, Wilson KL. 2011. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic “network of networks.” *Nature Review Molecular Cell Biology*. 12: 695–708.
  
- ❖ Sinensky, M., Fantle, K., Trujillo, M., McLain, T., Kupfer, A., Dalton, M. 1994. The processing pathway of prelamin A. *Journal of Cell Sciences*. 107: 61–67.
  
- ❖ Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. 2000. Executioner caspases-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant, roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 7320–7326.
  
- ❖ Smith, T. A., Strelkov, S. V., Burkhard, P., Aebi, U., Parry, D. A. 2002. Sequence comparisons of intermediate filament chains: evidence of a unique functional/structural role for coiled-coil segment 1A and linker L1. *Journal of Structural Biology*. 137: 128–145.
  
- ❖ 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 Journal*. 19: 3918–3931.
  
- ❖ Somech, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G., Simon, A. J. 2005. Nuclear envelopathies – raising the nuclear veil. *Pediatric Research*. 57: 85–155.

- ❖ Spann, T. P., Goldman, A. E., Wang, C., Huang, S., Goldman, R. D. 2002. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Biology*. 156: 603–608.
  
- ❖ Spann, T. P., Moir, R. D., Goldman, A. E., Stick, R., Goldman, R. D. 1997. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *Journal of Cell Biology*. 136: 1201–1212.
  
- ❖ Starr, D. A., Han, M. 2002. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science*. 298: 406–409.
  
- ❖ Starr, D. A., Hermann, G. J., Malone, C. J., Fixsen, W., Priess, J. R., Horvitz, H. R., Han, M. 2001. Unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development*. 128:5039–5050.
  
- ❖ Steen, R. L., Beullens, M., Landsverk, H. B., Bollen, M., Collas, P. 2003. AKAP149 is a novel PP1 specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G<sub>1</sub> phase. *Journal of Cell Sciences*. 116: 2237–2246.
  
- ❖ Steen, R. L., Martins, S. B., Tasken, K., Collas, P. 2000. Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *Journal of Cell Biology*. 150: 1251–1262.
  
- ❖ Stierle, V., Couprie, J., Ostlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H. J., Courvalin, J. C., Duband-Goulet, I. 2003. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry*. 42: 4819–4828.
  
- ❖ Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D., Aebi, U. 2003. Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *Journal of Molecular Biology*. 328:119–130.

- ❖ Strelkov, S. V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U., Herrmann, H. 2004. Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *Journal of Molecular Biology*. 343: 1067–1080.
  
- ❖ Stuurman, N. 1997. Identification of a conserved phosphorylation site modulating nuclear lamin polymerization. *FEBS Letters*. 401: 171–174.
  
- ❖ Stuurman, N., Heins, S., Aebi, U. 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *Journal of Structural Biology*. 122: 42–66.
  
- ❖ Stuurman, N., Sasse, B., Fisher, P. A. 1996. Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of *Drosophila* nuclear lamin head-to-tail binding. *Journal of Structural Biology*. 117: 1–15.
  
- ❖ Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L., Burke, B. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology*. 147: 913–920.
  
- ❖ Susor, A., Jansova, D., Cerna, R., Danylevska, A., Anger, M., Toralova, T., Malik, R., Supolikova, J., Cook, M. S., Su Oh, J., Kubelka, M. 2015. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR–eIF4F pathway. *Nature Communications*. 6: 6078.
  
- ❖ Tang, C. W., Mendoza, M. A., Martin, C., Zeng, K., Chen, S., Feret, D., Wilson, S. A., Jackson, D. A. 2008. The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells. *Journal of Cell Sciences*. 121: 1014 – 1024.
  
- ❖ Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., Van der Weyden, L., Champion, L., Kudo, N., R., Adams, D. J. 2010. Nasmyth, K. Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes and Developmental*. 24: 2505–2516.

Takizawa, C. G., Morgan, D. O. 2000. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1–Cdk1 and Cdc25C. *Current opinion in Cell Biology*. 12 (6): 658 – 665.

- ❖ Taniura, H., Glass, C., Gerace, L. 1995. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *Journal of Cell Biology*. 131: 33–44.
- ❖ Terasaki, M., Campagnola, P., Ellenberg, J., Hinkle, B., Slepchen, B. 2001. A new model for nuclear envelope break down. *Molecular Biology of the cell*. 12 (2): 503 – 510.
- ❖ Tolstonog, G. V., Sabasch, M., Traub, P. 2002. Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function. *DNA Cell Biology*. 21: 213–239.

Tomanek, M., Kopečný, V., Kanka, J. 1989. Genome reactivation in developing early pig embryos: an ultrastructural and autoradiographic analysis. *Anatomy and Embryology*. 180 (3): 309 – 316.

- ❖ Van Engelen, B. G., Muchir, A., Hutchison, C. J., Van der Kooij, A. J., Bonne, G., Lammens, M. 2005. The lethal phenotype of a homozygous nonsense mutation in the lamin A/C gene. *Neurology*. 64: 374–376.
- ❖ Vaughan, A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J. M., Broers, J. L., Ramaekers, F. C., Wehnert, M., Morris, G. E., Whitfield, W. G. F., Hutchison, C. J. 2001. Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *Journal of Cell Sciences*. 114: 2577–2590.
- ❖ Vecerova, J., Koberna, K., Malinsky, J., Soutoglou, E., Sullivan, T., Stewart, C. L., Raska, I., Misteli, T. 2004. Formation of nuclear splicing factor compartments is independent of lamins A/C. *Molecular Biology of the Cell*. 15: 4904–4910.

- ❖ Vergnes, L., Peterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G., Reue, K. 2004. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 101: 10428–10433.
  
- ❖ Vigers, G. P., Lohka, M. J. 1991. Regulation of nuclear envelope precursor functions during cell division. *Journal of Cell Sciences*. 102: 273 – 284.
  
- ❖ Vorburger, K., Kitten, G. T., Nigg, E. A. 1989. Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO Journal*. 8: 4007–4013.
  
- ❖ Walenta, J. H., Didier, A. J., Liu, X., Kramer, H. 2001. The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *Journal of Cell Biology*. 152: 923–934.
  
- ❖ Walther, T. C., Fornerod, M., Pickersgill, H., Goldberg, M., Allen, T. D., Mattaj, I. W. 2001. The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *EMBO Journal*. 20: 5703–5714.
  
  
- Walter, J., Sun, L., Newport, J. 1998. Regulated Chromosomal DNA Replication in the Absence of a Nucleus. *Molecular Cell*. 1 (4): 519 – 529.
  
- ❖ Ward, G. E., Kirschner, M. W. 1990. Identification of cell-cycle regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell*. 61: 561–577.
  
- ❖ Weber, K., Riemer, D., Dodemont, H. 1991. Aspects of the evolution of the lamin/intermediate filament protein family: a current analysis of invertebrate intermediate filament proteins. *Biochemical Society Transaction*. 19:1021–1023.

- ❖ Wilhelmsen, K., Litjens, S. H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., Van den Bout, I., Raymond, K., Sonnenberg, A. 2005. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *Journal of Cell Biology*. 171: 799–810.
  
- ❖ Wilson, K. L., Holaska, J. M., De Oca, R. M., Tifft, K., Zastrow, M., Segura-Totten, M., Mansharamani, M., Bengtsson, L. 2005. Nuclear membrane protein emerin: roles in gene regulation, actin dynamics and human disease. *Novartis Foundation Symposia*. 264: 51–62.
  
- ❖ Wolda, S. L., Glomset, J. A. 1988. Evidence for modification of lamin B by a product of mevalonic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 5997–6000.
  
- ❖ Wydner, K. L., McNeil, J. A., Lin, F., Worman, H. J., Lawrence, J. B. 1996. Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 32:474–478.
  
- ❖ Yang, L., Guan, T., Gerace, L. 1997. Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *Journal of Cell Biology*. 137: 1199–1210.
  
- ❖ Zhang, Q., Ragnauth, C. D., Skepper, J. N., Worth, N. F., Warren, D. T., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A., Shanahan, C. M. 2005. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *Journal of Cell Sciences*. 118: 673–687.
  
- ❖ Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M. S., Mizuuchi, K., Krause, M., Craigie, R. 2000. Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 97: 8997–9002.
  
- ❖ Zwerger, M., Medalia, O. 2013. From lamins to lamina: a structural perspective. *Histochemical Cell Biology*. 140 (1): 3 – 12.

## Přílohy

### Seznam zkratk a symbolů

AKAP149 – 149 kDa protein kinase A anchoring protein

AP1 – activating protein 1

Arp2/3 F – Aktin – komplex tvořící u moř. hvězdic aktinový obal zodpovědný za rozpad NE

BAF – barrier – to – autointegration factor

bp – base pair

BRCA2 – breast cancer gene 1

BrdU – bromodeoxyuridin

BSA – bovinní sérový albumin

CAAX – sekvence Laminu A a B zodpovědná za posttranslační modifikace

Cdc6 – cell division protein 6

Cdc14B – cell division cycle 14B

Cdk1 – cyklin – dependent kinase 1

C – fos – cellular protooncogenic transcription factor

CTA – chromosomal translational area

CTCF – transkripční represor

DAPI – 4', 6 – diamidin – 2 – fenyldiol

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ER – endoplazmatické retikulum

E2F – DP3 – transkripční faktor

FIU – fault injection unit

GAPDH – glyceraldehyd – 3 – phosphate dehydrogenase

GFAP – glial fibrillary acidic protein / gliový protein intermediálních filament

GFP – green fluorescent protein

GV – germinal vesicle

GVBD – germinal vesicle break down

HP1b – heterochromatin protein B

HSV – 1 – *herpes simplex* virus 1

IBMX – 3 – isobutyl – 1 – methylxanthine

INM – inner nuclear membrane

LAPs – lamin – associated polypeptides



LBR – lamin B receptor  
LDS – lithium dodecyl sulfate  
LINC – links the nucleoskeleton and cytoskeleton  
LMN – gen kódující laminy  
mAKAP – muscle A – kinase anchoring protein  
MAPK – Mitogen-activated protein kinase  
MEF – mouse embryonic fibroblast  
MI – metafáze I  
MII – metafáze II  
M16 – kultivační médium  
MOK2 – zinc finger protein  
MPF – maturation promoting factor  
MTOC – microtubule – organizing center  
NE – nuclear envelope  
NEBD – nuclear envelope break down  
NET – nuclear envelope transmembrane proteins  
NF – H – neurofilament heavy polypeptide  
NPC – nuclear pores complex  
NUMA – nuclear mitotic apparatus protein  
Nup – nucleoporin  
ONM – outer nuclear membrane  
PBS – phosphate – buffer saline  
PCNA – proliferating cell nuclear antigen  
PDS5 – kohezní faktor  
PKC – protein kinase C  
PMSG – pregnant mares serum gonadotropin  
PP1 – protein phosphatase 1  
PTA – perispindular translational area  
PVA – polyvinyl alcohol  
P150 – replikační protein  
p34Cdc2 – cyklin – dependent kinase 2 phosphoprotein  
Rb – retinoblastoma protein  
RFC – replication factor C

RNA – ribonukleová kyselina  
RNAi – interferující ribonukleová kyselina  
SREBP1 – sterol regulatory element – binding transcription factor 1  
SUN – proteinová doména NE  
TRIS – 2 – Amino – 2 – hydroxymethyl – propane – 1, 3 – diol  
TTBS – tris – tween buffered saline  
UNC – doména háďátka homologní k SUN savčí doméně  
ZMPSTE24 – zinková metaloproteináza  
ZYG – mikrotubulární vazebný protein háďátka obecného  
3T3 – buněčná linie myších fibroblastů

### **Seznam tabulek**

[Tabulka 1 Složení rozotoku A pro přípravu prasečího transfer média](#) (strana 38)

[Tabulka 2 Složení roztoku B pro přípravu prasečího transfer média](#) (strana 39)

[Tabulka 3 Relativní dynamika meiotického zrání v oocytech starých a mladých myši od rozpadu jaderné membrány po vydělení 1. pólového tělíska](#) (strana 55)

### **Seznam grafů**

[Graf 1 Tvorba asociovaných laminových struktur po NEBD u oocytů starých a mladých myši](#) (strana 52)

[Dynamika meiotického zrání v oocytech starých a mladých myši od rozpadu jaderné membrány po vydělení 1. pólového tělíska](#) (strana 55)

### **Seznam obrázků**

[Obrázek 1 Fosforylace laminu A / C v průběhu meiotického zrání](#) (strana 48)

[Obrázek 2 Aktivita histon H1 a MAP kinázy po znovuzahájení meiotického zrání](#) (strana 49)

[Obrázek 3 Buněčná lokalizace laminu A / C v oocytu mladých myší 2 hodiny po promytí od IBMX \(strana 50\)](#)

[Obrázek 4 Buněčná lokalizace laminu A / C v oocytu starých myší 2 hodiny po promytí od IBMX \(strana 51\)](#)

[Obrázek 5 Výskyt laminu A a C v oocytech a somatických buňkách \(strana 53\)](#)

[Obrázek 6 Přítomnost Laminu A a C a 50 kDa fragmentu laminu A v oocytech v průběhu meiotického zrání \(strana 54\)](#)