

Université de Montréal

La lamine A : localisation, maturation et interactions

par

A. Marie-Josée Sasseville

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en biologie moléculaire

Mars 1998

©A. Marie-Josée Sasseville, 1998



QH
506
U54
1998
V.014

Université de Montréal

École de génie chimique, mécanique et informatique

par

A. Marie-Josée Bouchard

Programme de biologie moléculaire

l'unité des études supérieures

Tout présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie (D. Sc.) (Ph.D.)
en biologie moléculaire

à la fin de

A. Marie-Josée Bouchard, 1998



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
La lamine A : localisation, maturation et interactions

présentée par :
A. Marie-Josée Sasseville

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Skup
Président du jury

Yves Raymond
Directeur de recherche

Anne-Marie Mes-Masson
Membre du jury

Jean-Pierre Julien
Examineur externe

Feridoun Babai
Représentant du doyen

Thèse acceptée le : 17 juin 1998

SOMMAIRE

Le cytosquelette donne à la cellule une morphologie et une plasticité particulières. De plus, il est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires telles le transport intracellulaire, la modulation des récepteurs de surface, la polarité des cellules, la mitose, la motilité cellulaire, le développement et la différenciation. Le cytosquelette est composé des microtubules, des microfilaments d'actine et des filaments intermédiaires. Ces molécules joueraient aussi un rôle dans la transduction de signaux entre les différents compartiments cellulaires et ce, de la surface au noyau. La lamina nucléaire est le principal élément structural présent dans le noyau.

La lamina nucléaire forme une structure protéique qui tapisse la membrane nucléaire interne de toutes les cellules eucaryotes. Les lamines sont des protéines de la famille des filaments intermédiaires. Leur structure comprend un domaine central enroulé en hélice- α , ainsi que des domaines N- et C-terminaux. Les lamines seraient, d'une part, impliquées dans le réassemblage de l'enveloppe nucléaire après la mitose et, d'autre part, auraient un rôle à jouer dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la chromatine. Il existe deux types de lamines : les lamines de type B qui sont présentes dans toutes les cellules et les lamines de type A qui apparaissent au cours du développement et de la différenciation. Ces lamines de type A comprennent les lamines A et C et sont produites par épissage alternatif. Elles ont en commun les 566 acides aminés de leur portion N-terminale, et ne diffèrent que par leurs domaines C-terminaux respectifs de 98 et 6 acides aminés. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré une association entre la chromatine et les lamines de type A.

Nous nous sommes intéressés à la lamine A, car elle semble particulièrement impliquée dans ces interactions. De plus, son processus de maturation, qui va de l'isoprénylation du précurseur à la formation d'une protéine mature de plus faible poids moléculaire ayant perdu le groupement isoprényle, est inhabituel.

Il a été récemment suggéré que les foyers de lamines qui se situent à l'intérieur de la lamina périphérique représenteraient des domaines nucléoplasmiques reliés au squelette nucléaire, et que les lamines seraient impliquées dans l'organisation de ces domaines. À l'aide d'un anticorps spécifique à la lamine A, nous avons observé la présence de cette protéine à l'intérieur du nucléoplasme. Afin de vérifier si cette localisation correspondait au squelette nucléaire, nous nous sommes associés à P. Cook, de l'Université d'Oxford. Ce groupe de recherche a mis au point une technique qui permet d'isoler un nucléosquelette qui reste actif dans la transcription et la

réplication. Ces travaux nous ont permis de montrer l'association de la lamine A au squelette nucléaire.

Mes travaux ont ensuite permis de localiser pour la première fois le précurseur de la lamine A dans des cellules. Ce précurseur se retrouve en foyers intranucléaires, ce qui nous permet de suggérer que cette molécule précurseur, qui a une demi-vie d'environ 90 minutes, aurait un rôle à jouer à ce niveau. Cette étude a aussi permis de démontrer que le précurseur non-isoprénylé de la lamine A est capable d'intégrer la lamina et que, par conséquent, l'isoprénylation transitoire de cette molécule pourrait avoir une fonction différente de celle suggérée jusqu'ici.

Le dernier objectif poursuivi était d'identifier les éléments de la chromatine impliqués dans l'interaction avec la lamine A. J'ai construit des mutants de délétions correspondant au C-terminus de la lamine A ainsi que des protéines de fusion avec la glutathione-S-transferase. Ces protéines de fusion m'ont permis d'identifier l'actine nucléaire comme protéine interagissant avec le C-terminus de la lamine A. Cependant, nos expériences n'ont pas permis de préciser si l'interaction implique une autre protéine ou un complexe multiprotéique. Plusieurs groupes travaillant sur l'actine nucléaire ont suggéré que les réarrangements des domaines intranucléaires seraient réalisés par l'intermédiaire d'un moteur contenant de l'actine. L'actine nucléaire serait aussi impliquée dans la réplication. La liaison des éléments de structure que sont la lamina, les protéines qui y sont associées et le nucléosquelette à l'élément contractile qu'est l'actine, permettrait d'effectuer des changements dans la structure de la chromatine.

Cette dernière découverte devrait permettre d'éclaircir le rôle fonctionnel de la lamine A et contribuer à l'identification des messagers des voies de transduction mécano-chimique.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
TABLE DES ILLUSTRATIONS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xii
DÉDICACE	xiii
INTRODUCTION	1
1 LA CELLULE	2
2 ARCHITECTURE DE LA CELLULE.	2
2.1 LE CYTOSQUELETTE	2
2.1.1 Les microtubules	4
2.1.2 Les microfilaments	6
2.1.3 Les filaments intermédiaires	7
2.1.3.1 Classification	7
2.1.3.2 Structure et assemblage	8
2.1.4 Cytosquelette et transmission de signal.	11
2.1.4.1 L'intégrité des tensions «tensegrity» et la percolation	13
2.2 ARCHITECTURE DU NOYAU.	15
2.2.1 Enveloppe et pores nucléaires	16
2.2.2 Nucléole et chromatine	18
2.2.3 Matrice nucléaire et nucléosquelette	19
2.2.4 Actine nucléaire	21

3 LA LAMINA NUCLÉAIRE.	23
3.1 FILAMENTS INTERMÉDIAIRES NUCLÉAIRES	23
3.2 GÈNES DES LAMINES ET ÉVOLUTION	26
3.3 EXPRESSION DES LAMINES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA DIFFÉRENCIATION	27
3.4 LA PHOSPHORYLATION DES LAMINES	34
3.5 PROCESSUS DE MATURATION DES LAMINES	37
3.6 LOCALISATION INTRANUCLÉAIRE DES LAMINES	42
3.7 INTERACTIONS DES LAMINES AVEC D'AUTRES ÉLÉMENTS CELLULAIRES	44
3.8 FONCTIONS ET DYNAMIQUE DES LAMINES AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE	50
4 OBJECTIFS	54-B
RÉSULTATS	55
1 LES LAMINES FORMENT UN NUCLÉOSQUELETTE EN PLUS D'UNE LAMINA PÉRIPHÉRIQUE DANS LES CELLULES HUMAINES.	56
2 LE PRÉCURSEUR DE LA LAMINE A EST LOCALISÉ DANS DES FOYERS INTRANUCLÉAIRES.	87
3 INTERACTION <i>IN VITRO</i> DU DOMAINE C-TERMINAL DE LA LAMINE A AVEC L'ACTINE.	126
DISCUSSION GÉNÉRALE	147
1 ASSOCIATION ENTRE LA LAMINE A ET LE NUCLÉOSQUELETTE	148
2 LA MATURATION DE LA LAMINE A <i>IN VIVO</i>	151
3 LA LAMINE A INTERAGIRAIT AVEC UN «MOTEUR» NUCLÉAIRE	155
4 CONCLUSIONS	156
5 SPÉCULATIONS	157
BIBLIOGRAPHIE	160

ANNEXE I	xiv
----------	-----

1 SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS MONOCLONAL 133A2	xv
---	----

ANNEXE II	xvii
-----------	------

1 ESSAIS DE LIAISON DU DOMAINE C-TERMINAL DE LA LAMINE A SUR MEMBRANE	xviii
--	-------

 TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1	Structure et modèle d'assemblage des protéines des FIs.	9
Figure 2	Structure du noyau en interphase.	16
Figure 3	Modèle d'assemblage des différentes structures composant le CPN.	17
Figure 4	Modèle d'assemblage des lamines nucléaires	24
Figure 5	Modèle de l'évolution des gènes des FIs à partir du gène ancestral des lamines.	26
Figure 6	Comparaison des SLNs des lamines humaines et de l'antigène grand T de SV-40.	37
Figure 7	Séquence des lamines A/C humaines.	39
Figure 8	Dynamique des lamines au cours du cycle cellulaire	54-A

RÉSULTATS

1. LES LAMINES FORMENT UN NUCLÉOSQUELETTE EN PLUS D'UNE LAMINA PÉRIPHÉRIQUE DANS LES CELLULES HUMAINES.

Figure 1	Mapping the epitope recognized by monoclonal antibody 133A2.	75
Figure 2	Removing most of the chromatin improves detection of lamin.	76
Figure 3	Specificity of monoclonal antibody 133A2.	77
Figure 4	Visualization of an internal nucleoskeleton in HeLa cells from which ~90% chromatin had been removed.	78
Figure 5	Lamins detected in nuclear regions of HeLa cells by immunogold labelling.	79
Figure 6	Characterization of the diffuse nucleoskeleton in HeLa cells.	80

2. LE PRÉCURSEUR DE LA LAMINE A EST LOCALISÉ DANS DES FOYERS INTRANUCLÉAIRES.

Figure 1	Schematic representation of lamin A precursor, mature, and truncated (NΔ562) forms.	112
Figure 2	The S4 antiserum recognizes specifically the lamin A precursor.	113
Figure 3	The S4 antiserum recognizes mainly the full-length form of recombinant lamin A.	114
Figure 4	The lamin A precursor is present in nuclear foci.	115
Figure 5	Competition with full-length lamin A abolishes the foci pattern of lamin A precursor.	116
Figure 6	Lamin A precursor foci are located within the nuclear space.	117
Figure 7	MVN treatment forces the accumulation of lamin A precursor in the peripheral lamina.	118
Figure 8	Competition with full-length lamin A abolishes the lamina and foci pattern of lamin A precursor.	119
Figure 9	The lamin A precursor is assembled in the lamina of MVN-treated cells.	120

3. INTERACTION *IN VITRO* DU DOMAINE C-TERMINAL DE LA LAMINE A AVEC L'ACTINE

Figure 1	(A) Diagrams of lamin A and C and of lamin A deletion mutants. (B) Purified proteins.	138
Figure 2	Interaction of HEp-2 cellular proteins with GST and GST-Lam A (NΔ562CΔ18).	139
Figure 3	Subcellular fractionation.	140
Figure 4	Interaction of proteins from subcellular fractions of A549 cells with GST and GST-Lam A (NΔ562CΔ18).	141
Figure 5	Identification of the 43 kDa protein interacting with GST-Lam A (NΔ562CΔ18) as actin.	142

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. ASSOCIATION ENTRE LA LAMINE A ET LE NUCLÉOSQUELETTE

Figure 1	Schéma de la lamine A	149
----------	-----------------------	-----

ANNEXE I

1 SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS MONOCLONAL 133A2

Figure 1 L'Acm 133A2 est spécifique pour la lamine A xvi

ANNEXE II

1 ESSAIS DE LIAISON SUR MEMBRANE DU DOMAINE C-TERMINAL DE LA LAMINE A

Figure 1 Essai de liaison sur membrane xix

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac :	anticorps
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
Ag :	antigène
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	adénosine triphosphate
CE :	carcinomes embryonnaires
CPN :	complexes des pores nucléaires
EN :	enveloppe nucléaire
FEISEM :	field emission in lens scanning electron microscopy
FI :	filaments intermédiaires
F.I.E. :	focalisation isoélectrique
5-IAF :	5-iodoacetamidofluorescein
kDa :	kilodalton
LAP :	lamina associated polypeptide
LBR :	récepteur de la lamine B
mAb :	anticorps monoclonal
MAPs :	Microtubule Associated proteins
MARs :	Matrice attachment regions
ME :	microscopie électronique
MEC :	matrice extracellulaire
MIPs :	Microtubule Interacting proteins
MVA :	mevalonate
MVN :	mevinoline
NF :	neurofilaments (H : heavy) (L : light) (M : medium)
N-SCLC :	Non Small Cell Lung Cancer
PCNA :	proliferating cell nuclear antigen
pI :	point isoélectrique
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PM :	poids moléculaire
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acetate
RE :	réticulum endoplasmique
SCLC :	Small Cell Lung Cancer
SLN :	signal de localisation nucléaire

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Yves Langelier, pour son soutien et sa présence, pour ses judicieux conseils et pour les nombreuses discussions qui m'ont aidé dans ma formation de Ph.D.

Je tiens à remercier Yves Raymond, pour m'avoir permis de travailler sur les lamines nucléaires, pour m'avoir initié au travail de laboratoire et aux méthodes de recherche scientifique.

Je tiens à remercier Rashmi Kothary, Lee Wall et Richard Bertrand pour leur soutien et leur confiance.

Je veux aussi remercier mes parents, pour leurs encouragements et leur confiance et, Réjane Ferguson, ma tante, qui me soutient depuis mon retour aux études et qui a, à maintes reprises, pris soin de mes enfants pour me permettre de travailler.

Je tiens aussi à remercier le Conseil de recherche médicale du Canada, la Faculté des études supérieures et Canderel pour leur soutien financier.

Et aussi, et du fond du coeur, tous les gens de l'Institut du cancer ou du Centre de recherche du Pavillon Notre-Dame avec qui j'ai fraternisé pendant toutes ces années. Dans tous ces moments, heureusement qu'il y a les copains.

DÉDICACE

À la mémoire de proches qui m'ont appuyée avec conviction.

*À Jeanne Giguère Sasseville
(15-06-01 au 23-10-84)*

*À Yvonne Athot Ferguson
(30-07-03 au 13-01-94)*

*André Major
(28-02-16 au 07-05-93)*

*À Yvette Giguère Major
(27-04-15 au 07-10-96)*

*À Roland Sasseville
(18-07-30 au 28-01-97)*

À mon père, mon ami,

*Ton départ précipité a provoqué une blessure profonde , un grand vide.
Tu nous as appris à suivre nos convictions et à aller de l'avant dans toutes
circonstances. Ta force reste parmi nous et bien que nos rapports n'aient
plus la même dimension qu'avant, je continuerai à exprimer mes idées et à
m'impliquer dans mon milieu tel que tu nous l'a enseigné. Je t'offre ce
travail.*

*Papa, je t'aime.
J'irai jusqu'au bout*

À mes enfants, Karl, Christopher et Tristan.

*Pour eux, par eux, comprendre les mécanismes de la vie. Que l'avenir leur
sourit, car ils sont cet avenir.*

INTRODUCTION

1 LA CELLULE

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle fondamentale des organismes vivants. Les cellules eucaryotes sont le siège d'une multitude de réactions biochimiques et physiques qui sont coordonnées avec précision. De nombreux compartiments, organelles et réseaux de communications intra et intercellulaires sont essentiels au bon fonctionnement des cellules. L'organisation cellulaire repose sur un squelette cellulaire complexe qui constitue la base de l'architecture de la cellule. Les travaux présentés dans cette thèse porteront sur la lamine A, un des éléments de ce squelette cellulaire.

2 ARCHITECTURE DE LA CELLULE.

2.1 LE CYTOSQUELETTE

Dans les cellules eucaryotes, les microtubules (25 nm), l'actine (5-9 nm) et les filaments intermédiaires (9-12 nm) interagissent pour former le cytosquelette. Ces polymères sont reliés par des interactions macromoléculaires qui conduisent à la formation d'un réseau tridimensionnel. Ce réseau de molécules donne à la cellule une morphologie et une plasticité particulières, en plus d'être impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires telles le transport intracellulaire, la modulation des récepteurs de surface, la polarité des cellules, la mitose, la motilité cellulaire, le développement et la différenciation [Maccioni et Cambiazo, 1995 ; Wiley et al., 1990]. Ces molécules joueraient aussi un rôle dans la transduction de signaux entre les différents compartiments cellulaires et ce, de la surface au noyau. L'évolution des méthodes de préparation des cellules pour la microscopie électronique (ME) a permis d'observer les filaments interreliés du cytosquelette et leur ancrage jusqu'au niveau de la lamina nucléaire [Penman, 1995]. Au niveau de la membrane cytoplasmique, le cytosquelette

est relié aux jonctions intercellulaires, ainsi qu'aux plaques d'adhésion. L'organisation du cytosquelette ainsi que son dynamisme dépendent des associations des différentes molécules qui le composent pour former des filaments ainsi que de leurs interactions avec des molécules régulatrices. Les interactions hétérologues jouent non seulement un rôle dans le maintien des structures du cytosquelette mais régulent aussi l'assemblage en filaments, ainsi que les relations entre les différents types de filaments qui forment le cytosquelette. Ces relations entre différents types de filaments définiraient le patron organisationnel du cytosquelette, en réponse aux besoins fonctionnels de la cellule. La découverte récente de protéines qui relient les filaments intermédiaires aux autres éléments du cytosquelette [Yang et al., 1996] permettra de mieux comprendre les interactions des différents éléments de cette structure. L'importance des éléments du cytosquelette est aussi révélée par l'implication de ces protéines dans plusieurs pathologies [revue dans Kunze et Rustow, 1993]. Par exemple, dans l'*Epidermolysis Bullosa Simplex* qui est une maladie génétique autosomale dominante rare, des amoncellements de kératines précèdent la dégénération cellulaire [Fuchs, 1995 ; 1996]. Les patients atteints de cette maladie ont des mutations ponctuelles ou de courtes délétions dans les gènes des kératines 14 ou 5. Des modifications de la spectrine, qui est la principale composante du cytosquelette des érythrocytes, associées ou non à des déficiences dans d'autres protéines du cytosquelette membranaire conduisent à des anémies (la sphérocytose héréditaire, l'elliptocytose héréditaire et la pyropoikilocytose héréditaire [revue dans Kunze et Rustow, 1993]. D'autres pathologies sont causées par des déficiences dans des protéines associées aux microfilaments d'actine. C'est le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne, dans laquelle la dystrophine est pratiquement absente. En ce qui concerne les lamines, il a été observé que la lamine A avait une organisation anormale dans des lignées cellulaires de carcinomes pulmonaires, suggérant que cette protéine de la famille des filaments intermédiaires pourrait être

impliquée dans le cancer [Machiels et al., 1995] (ce sujet sera discuté plus en détails à la section 3.3).

2.1.1 Les microtubules

Les microtubules ont un diamètre de 25 nm et une paroi de 6 nm qui comporte 13 protofilaments formés par l'assemblage de sous unités de tubuline α et β . Les microtubules ont une forme tubulaire et sont de longueur variée. Ces polymères irradient de sites d'orientation localisés dans le cytoplasme comme les centrioles, les corpuscules basaux des cils et les centromères. Une troisième sous-unité de tubuline a été identifiée, la tubuline γ [Avila, 1992]. Cette sous-unité est présente au niveau des centrosomes et serait impliquée dans la duplication des centrioles [Lange et Gull, 1996]. Les microtubules sont polarisés, i.e. qu'ils ont une extrémité «plus» à laquelle la polymérisation/dépolymérisation de la tubuline est plus rapide qu'à l'extrémité «moins». Les microtubules sont impliqués dans différentes fonctions comme la détermination de la morphologie cellulaire, la ségrégation des chromosomes, la motilité cellulaire, l'organisation intracellulaire ainsi que le transport des organelles [Avila, 1992]. Il existe plusieurs protéines associées aux microtubules (MAPs) ainsi que des protéines interagissant de façon plutôt transitoire avec les microtubules (MIPs). Ces protéines auraient un rôle majeur à jouer dans la régulation de l'assemblage des microtubules, ainsi que dans l'organisation du cytosquelette et de ses interactions avec d'autres composantes cellulaires [Maccioni et Cambiazo, 1995]. Certaines MAPs sont exprimées dans plusieurs tissus alors que d'autres sont exprimées de façon tissu spécifique. L'expression de plusieurs de ces protéines est régulée au cours du développement. Plusieurs MAPs lient la portion carboxy-terminale de la tubuline. Les protéines Tau, MAP-2 et MAP-4 lient les microtubules ainsi que les filaments d'actine. Les MAPs seraient donc impliquées dans les interactions des microtubules et des

filaments d'actine. De plus, certaines MAPs interagiraient aussi avec des filaments intermédiaires. Des études récentes ont montré l'existence de MIPs qui sont importantes pour la survie des cellules. Ainsi, CLIP-170 (cytoplasmic linker protein-170) servirait de lien entre les microtubules et les vésicules de transport, les gephyrines moduleraient les interactions des récepteurs de surface avec le cytosquelette, alors que d'autres protéines comme NuMA (nuclear/mitotic apparatus protein) s'associeraient avec les centrosomes et le fuseau mitotique, et seraient impliquées dans des événements du cycle cellulaire.

Les dynéines et les kinésines sont deux autres familles importantes de protéines interagissant avec les microtubules [Barton et Goldstein, 1996]. Ces deux grandes familles représentent les «moteurs» des microtubules et leurs membres seraient impliqués, à différents niveaux, dans la ségrégation des chromosomes. La coordination de toutes ces activités motrices n'est pas très bien connue, mais certains supposent que l'activité des moteurs mitotiques et méiotiques pourrait être régulée par des changements de tension au niveau des filaments. De cette façon, la propriété des microtubules de ressentir et de répondre aux changements de tension le long de leur structure permettrait une communication entre les moteurs des pôles du fuseau et ceux des chromosomes et, par la tension dans les microtubules astraux, avec les moteurs situés au cortex de la cellule. Par conséquent, plusieurs signaux qui conduisent à la prolifération cellulaire seraient transmis via le changement d'activité des protéines motrices qui génèrent des forces au cours de la division cellulaire. Ces événements régulateurs s'intégreraient aux cascades de transmission de signaux du cycle cellulaire. Les concepts qui sous-tendent les hypothèses de transmission de signaux par des changements de tension seront détaillés dans la section 2.1.4.1.

2.1.2 Les microfilaments

Les microfilaments ont un diamètre de 5 à 9 nm et sont constitués d'une double rangée hélicoïdale d'actine globulaire. Il est généralement reconnu que les filaments d'actine constituent la base physique de la structure et des propriétés dynamiques du cytosquelette et des sarcomères des muscles. Dans le cytoplasme des cellules non-musculaires, l'actine F (polymérisée) est en équilibre avec l'actine G (globulaire). Cet équilibre est affecté par des protéines qui lient spécifiquement l'actine F ou G. Les principales composantes des microfilaments sont, outre l'actine, la myosine, la tropomyosine, la troponine, la vinculine et l'actinine. Les microfilaments contiennent aussi différentes protéines liant l'actine (Actin-binding protein/ABPs); ces associations mènent à la formation de structures uniques ou permettent d'effectuer des fonctions cellulaires spécifiques. Les microfilaments sont essentiels pour maintenir la morphologie, les propriétés mécaniques et la motilité de la cellule. Ils seraient aussi impliqués dans la transmission de signaux. Il existe plusieurs "actin-related proteins" ou ARPs qui semblent être dérivées d'un ancêtre commun de l'actine [Mullins et al., 1996]. Certaines de ces protéines auraient une structure «actin-fold» et un site de liaison des nucléotides, similaires à ceux de l'actine mais divergeraient au niveau des résidus impliqués dans les interactions avec d'autres protéines. À ce jour, Arp-1 est celle qui ressemble le plus à l'actine conventionnelle. Ces protéines Arps pourraient jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Bien que l'actine soit la protéine la plus abondante du cytoplasme, sa présence dans le noyau a été clairement démontrée ([Amankwah et De Boni, 1994] et les références citées). Cette observation sera détaillée plus à fond au point 2.2.4.

2.1.3 Les filaments intermédiaires

Le troisième type de filaments connus à ce jour sont les filaments intermédiaires (FI). Leur nom vient du fait que leur diamètre est d'environ 10 nm, ce qui les situe entre les microfilaments et les microtubules. Les membres de la famille des FIs les plus connus incluent les kératines, la vimentine, la desmine, les neurofilaments et les lamines. Ces protéines sont exprimés de façon tissu spécifique et leur patron d'expression au cours du développement et de la différenciation sont souvent complexes. Par exemple, les cellules souches neuroépithéliales co-expriment la vimentine et la nestine, alors que dans les neurones post-mitotiques, la nestine cesse d'être exprimée et l' α -internexine apparaît. Les protéines des neurofilaments (NF), NF-L (light) et NF-M (medium) sont co-exprimées durant la croissance de l'axone et lorsque l'axone atteint sa cible, la vimentine disparaît. Par la suite, la protéine NF-H (heavy) est exprimée, et elle copolymérise avec NF-L et NF-M dans les neurones matures (tiré de [Eyer et Peterson, 1994]). Depuis plusieurs années des études ont démontré que les FIs sont liés à des organelles membranaires (revue dans [Georgatos et Maison, 1996]). L'attachement des lamines à l'enveloppe nucléaire, ainsi que l'ancrage des organelles cytoplasmiques aux desmosomes via les FIs, semblent dynamiques et fortement régulés. Par conséquent, il a été suggéré que les FIs ou les protéines des FIs joueraient un rôle essentiel dans le développement et la différenciation en modulant les propriétés des membranes.

2.1.3.1 Classification

Les FIs ont été classifiés en différents types en fonction de l'homologie de leur domaine en hélice- α [Fuchs et Weber, 1994]. Les FIs de type I et II sont représentés par les kératines qui se retrouvent dans les cellules de type épithéliales. Les kératines

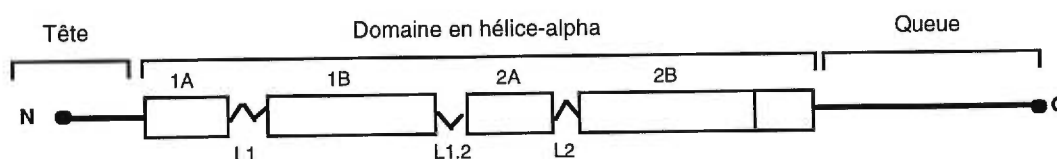
de type I sont les plus acides (point isoélectrique (pI) = 4-6) alors que les kératines de type II sont plutôt basiques (pI = 6-8). Ces protéines forment des hétéropolymères *in vitro*, une kératine de type I s'associant avec une kératine de type II. Les filaments de type III comprennent principalement la vimentine dans les cellules mésenchymateuses, la desmine dans les cellules musculaires, le GFAP (glial fibrillary acidic protein) dans les cellules gliales et les astrocytes et la périphérine dans les neurones. Les protéines de type III peuvent former des homopolymères ou des hétéropolymères avec d'autres protéines de type III. Les neurofilaments : NF-L (light), NF-M (medium) and NF-H (heavy) et l' α -internexine composent les FI de type IV. Elles se retrouvent dans les neurones. Les neurofilaments forment des hétéropolymères alors que l' α -internexine peut former des homopolymères. Les FIs de type V comprennent les protéines qui composent la lamina nucléaire. Ces protéines sont exprimées dans toutes les cellules eucaryotes à l'intérieur desquelles elles forment une structure protéique, localisée entre la chromatine et la membrane nucléaire interne, et qui semble interagir avec ces deux composantes nucléaires. Ces protéines seront décrites de façon approfondie au point 3. Récemment, de nouvelles protéines de la famille des filaments intermédiaires ont été découvertes mais elles ne peuvent être correctement classifiées dans aucun des 5 types principaux. Par exemple, la nestine est une protéine dont le domaine en hélice- α permettrait une classification dans le type III mais dont le domaine carboxy-terminal et la structure du gène se rapprochent du type IV.

2.1.3.2 Structure et assemblage

Les protéines de la famille des filaments intermédiaires ont en commun certaines caractéristiques : i) elles sont capables de se polymériser en filaments de 10 nm, ii) l'organisation de leurs gènes, semblant dériver d'un ancêtre commun, permet de les diviser en différentes classes et iii) elles possèdent un domaine central α -hélicoïdal ainsi

que des domaines amino et carboxy terminaux. Les domaines en hélice- α comprennent une sous-structure en heptade dans laquelle les positions 1 et 4 sont occupées par des résidus apolaires, de façon à ce que la surface de l'hélice serve de domaine de dimérisation entre les polypeptides [Shoeman et Traub, 1993]. Cette dimérisation est stabilisée par des interactions hydrophobes. Le domaine α -hélicoïdal (voir figure 1A)

A)



B)

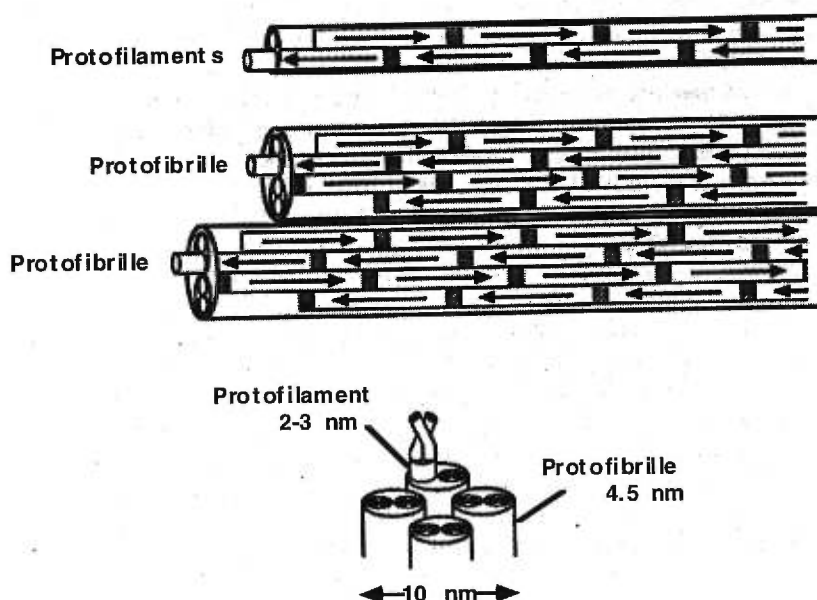


Figure 1 Structure et modèle d'assemblage des protéines des FIs.

A) Structure secondaire des protéines des filaments intermédiaires. B) Modèle d'assemblage des filaments intermédiaires. Les boîtes représentent les segments enroulés des dimères; les flèches indiquent le sens des polypeptides du N-terminus vers le C-terminus. Les boîtes hachurées représentent la portion de recouvrement entre l'hélice 2B d'un dimère et l'hélice 1A de l'autre. Dans ce modèle, l'alignement des dimères au niveau de l'association protofibrille-protofibrille est antiparallèle et décalé [Fuchs et Weber, 1994].

est subdivisé par trois segments de liaisons (L1, L1.2 et L2), qui ne sont pas hélicoïdaux et qui contiennent souvent une proline ou de multiples résidus glycine. Les sous-domaines en hélice- α sont les hélices 1A, 1B, 2A et 2B.

Les filaments sont formés d'abord par des dimères produits par l'enroulement de deux domaines centraux dans une orientation unidirectionnelle et parallèle, ce qui forme une double hélice [Fuchs, 1996 ; Fuchs et Weber, 1994]. Bien que la double hélice soit la base de l'assemblage des filaments, les domaines N et C-terminaux (en particulier la tête N-terminale) auraient aussi un rôle à jouer dans l'assemblage et la stabilité des filaments. De plus, ces régions pourraient contrôler les associations latérales au niveau des protofilaments et des protofibrilles. La capacité de ces protéines à former des filaments de 10 nm *in vitro* sans la présence de protéines auxiliaires suggère que l'information nécessaire à cet assemblage est intrinsèque. Les dimères s'associent de façon antiparallèle pour former des tétramères stables (aussi appelés protofilaments). Il y a cependant une controverse au sujet du décalage ou de l'alignement des domaines structuraux des différents dimères au niveau de l'assemblage des protofilaments. Deux protofilaments de 2-3 nm, s'associeraient en protofibrilles de 4-5 nm et un filament serait composé de 4 protofibrilles tel que démontré dans la figure 1.

Les filaments intermédiaires forment une structure dynamique. Il a été démontré, par des expériences de «fluorescence-bleaching» et des microinjections, que des peptides inhibant l'assemblage ainsi que des protéines de FIs exogènes pouvaient rapidement intégrer les filaments existants dans les cellules [Goldman et al., 1996 ; Okabe et al., 1993 ; Vikstrom et al., 1992]. Le dynamisme des FIs est facilement observable lors de la réorganisation des réseaux de filaments intermédiaires au cours du cycle cellulaire. Cette réorganisation est régulée par la phosphorylation, notamment par des kinases de type cdc-2. Des sites de phosphorylation aux extrémités du domaine en hélice- α permettent le désassemblage des filaments, en modulant de façon transitoire

les interactions thermodynamiques des sous-unités. Il existe aussi des sites de phosphorylation localisés dans la queue de certaines protéines des filaments intermédiaires. La phosphorylation de ces sites n'influencerait pas la polymérisation mais pourrait interférer dans les interactions avec d'autres protéines.

2.1.4 Cytosquelette et transmission de signal.

L'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire (MEC) est un élément important de l'intégrité et de l'organisation des tissus. Durant les dernières années, plusieurs groupes ont démontré que l'adhésion à la MEC est impliquée dans la régulation de la fonction des cellules [Schwartz et Ingber, 1994] ; cette adhésion se fait via des récepteurs transmembranaires dont plusieurs font partie d'une grande famille de récepteurs appelés intégrines. Streuli et al. [1991] ont mis au point un système de culture cellulaire qui permet d'éviter les contacts entre les cellules. Des cellules épithéliales mammaires sont enrobées d'une matrice riche en laminine et cultivées en suspension. Ce système leur a permis de démontrer que le contact avec la laminine était suffisant pour permettre la production de β -caséine. Ils ont aussi démontré, à l'aide d'anticorps bloquant la fonction des intégrines, que le signal se propageait via ces dernières. D'autres groupes ont montré que la sécrétion d'albumine par les cellules hépatiques était aussi dépendante de la MEC. L'identification de gènes, dont l'expression dépend de la présence de la MEC pour leur transcription, a d'ailleurs conduit à la découverte d'éléments de réponse à la MEC dans leur promoteur [Schmidhauser et al., 1992].

Suite à l'observation que la composition de la matrice nucléaire changeait selon la composition de la MEC, Bissel et al. [1982] ont postulé que la MEC lierait des récepteurs qui, à leur tour, interagiraient avec le cytosquelette d'actine, qui serait ultimement couplé à la matrice nucléaire. Cette hypothèse conduit au concept de

mécanotransduction de signal et cadre assez bien avec le concept de «tensegrity» développé à la même époque par D.E. Ingber et qui est décrit au point suivant.

Il a été par la suite clairement établi que l'attachement des cellules à la matrice pouvait aussi, entre autres, induire l'agglomération de molécules d'intégrines, provoquant des cascades de phosphorylation, notamment l'activation de FAK (focal adhesion kinase), une protéine kinase qui colocalise avec les sites d'adhésion focale, et des changements dans les concentrations intracellulaires de calcium [revue par Clark et Brugge, 1995]. Ces observations ont suggéré que les signaux générés par les intégrines pouvaient ressembler aux voies de transmission de signaux activées par des facteurs de croissance. Cependant, bien que les interactions de la MEC et du cytosquelette aient été bien établies depuis une dizaine d'années, les voies biochimiques de transmission sont encore mal caractérisées.

Il a aussi été démontré récemment que H-ras, qui est une petite protéine liant le GTP et Raf-1, qui est la kinase activant ras, seraient des régulateurs négatifs de l'activation des intégrines [Hughes et al., 1997]. De plus, des microinjections de formes activées de Rac et de Rho, qui sont aussi de petites protéines liant le GTP, ont montré que ces protéines ont des effets biologiques sur les microfilaments d'actine [Allen et al., 1997 ; Lamarche et al., 1996]. Dans le cas de Rac, sa capacité à induire la progression du cycle cellulaire corrèle avec la polymérisation de l'actine et la formation de complexes d'intégrines. Ces dernières expériences qui permettent d'établir des liens entre le cytosquelette et certaines des voies connues de transmission de signaux démontrent bien la complexité de ces mécanismes moléculaires.

Les observations récentes indiquant que l'induction de l'expression de la β -caséine dans des cellules épithéliales mammaires par leur attachement à la MEC requière à la fois une réorganisation morphologique des cellules et la génération de signaux biochimiques [Roskelley et al., 1994] ont amené le groupe de Bissell à suggérer que la MEC pourrait, par la coordination de la structure du cytosquelette et du noyau, faciliter

les interactions des régulateurs qui seraient autrement trop éloignés pour interagir [Boudreau et al. 1995].

2.1.4.1 L'intégrité des tensions «tensegrity» et la percolation

Donald E. Ingber a proposé en 1981 que l'organisation architecturale du squelette des cellules pouvait reposer sur le concept de la «tensegrity», concept d'abord énoncé par Buckminster Fuller pour décrire des sculptures. La «tensegrity» était alors décrite comme un système structural basé sur les interactions dynamiques d'éléments de compression en série discontinue, qui sont connectés par des câbles de tension en série continue [Pienta et Hoover, 1994]. Selon Ingber, les interactions actine-myosine dans les microfilaments contractiles seraient responsables de la tension générée dans l'assemblage tridimensionnel du cytosquelette, incluant les microfilaments, les microtubules et la matrice nucléaire [Ingber, 1993]. L'adaptation biologique du modèle de la «tensegrity» est moins rigide que le modèle des sculptures. Dans le modèle de base, les connections sont fortes et suivent des règles rigides. Une structure de ce type contient le minimum absolu d'éléments structuraux nécessaires à sa stabilité et sa construction implique une pré-tension. Par contre, le cytosquelette est composé d'une multitude d'éléments reliés de façon complexe. Cette complexité qui pourrait même permettre une redondance est un atout pour un système biologique qui doit se garder des voies de réserve. Dans la cellule, le relâchement d'un filament ne conduira pas à l'affaissement de la cellule entière.

En 1995, G. Forgacs propose une approche basée sur la percolation, un phénomène bien connu dans les sciences physiques [Forgacs, 1995]. La percolation y est utilisée pour expliquer les propriétés d'un grand nombre de phénomènes où interagissent différents éléments distribués au hasard, ou sans répétition évidente. La percolation a été utilisée pour modéliser des phénomènes aussi divers que la formation

de gel à partir de solutions de polymères, la formation de galaxies et les propriétés de réseaux de communications téléphoniques. Dans tous ces systèmes, la connectivité joue un rôle essentiel. La percolation implique une transition de phase de second ordre; au point de transition appelé 'seuil de percolation' (qui est souvent une concentration critique des éléments de base) apparaît une phase où l'interconnexion des unités de base devient telle qu'elle peut s'étendre d'une extrémité du système à l'autre. Selon Forgacs, le phénomène de percolation peut servir à modéliser les changements qui se produisent dans les remaniements constants du cytosquelette où des liens sont continuellement coupés tandis que d'autres sont établis. La percolation, qui incorpore une grande flexibilité dans les interconnexions du réseau de filaments, semble être plus appropriée que le modèle de «tensegrity» pour décrire la dynamique du cytosquelette. Les réseaux impliqués dans la percolation intègrent en partie les principes de la «tensegrity» ou pourraient être en partie des réseaux de «tensegrity». Ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et seraient même complémentaires dans l'explication de la transduction de signal via le cytosquelette. Ingber [1997] a récemment publié une revue sur la «tensegrity» comme base architecturale de la mécanotransduction cellulaire. Dans cette revue, il décrit certains résultats expérimentaux qui appuient l'hypothèse de la «tensegrity». Par exemple, il suggère qu'une activation des intégrines, conduisant à des modifications géométriques de l'échafaudage du cytosquelette, pourrait permettre le contact entre un enzyme et son substrat de façon à accélérer une signalisation. Il explique ainsi les résultats de Chen et Grinnell [1995] sur le relargage de calcium et de neurotransmetteurs par les nerfs moteurs terminaux qui est induit en 10 ms après l'activation des intégrines. Dans une autre série de travaux, lorsqu'une traction était exercée sur les intégrines, les filaments du cytosquelette se réorientaient, les noyaux se déformaient et les nucléoles se redistribuaient le long de l'axe d'application de la tension [Maniotis et al., 1997]. Ces événements se produisant à une vitesse 10 à 100 fois inférieure au temps qui serait nécessaire pour polymériser des filaments, les auteurs ont

suggéré que la transmission des messages conduisant à des changements structuraux serait mécanique. Ce mécanisme pourrait permettre à la cellule des changements dans sa structure cellulaire et nucléaire, en réponse à des changements dans l'adhésion à la matrice extracellulaire. Le message mécanique se rendrait ainsi jusqu'au noyau.

Certaines protéines des FIs, comme la desmine et la vimentine, seraient reliées à des récepteurs de la membrane nucléaire et de la membrane plasmique [Bloom et al., 1996 ; Georgatos et Blobel, 1987a ; Georgatos et Blobel, 1987b ; Georgatos et al., 1987 ; Lockard et Bloom, 1993]. Ces associations en font de bons candidats pour transmettre un signal mécanique.

2.2 ARCHITECTURE DU NOYAU.

Les cellules eucaryotes sont caractérisées par la présence d'un noyau entouré d'une enveloppe nucléaire composée d'une double membrane percée de pores nucléaires. Bien que la compartimentalisation fonctionnelle du cytoplasme des cellules eucaryotes soit bien connue et acceptée, la présence de domaines fonctionnels à l'intérieur du noyau est moins évidente. Le concept de compartimentalisation du noyau a d'abord émergé via la découverte de sites spécifiques à certaines activités comme la transcription, le processing de l'ARN et la réplication. Suite à ces découvertes, les domaines macromoléculaires du noyau ont été décrits [Spector, 1993] et, depuis, le concept d'une organisation fonctionnelle de ces différents domaines est de plus en plus accepté [revue dans Spector, 1996 ; Strouboulis et Wolffe, 1996]. La variété des activités métaboliques ayant lieu dans le noyau suggère un haut niveau d'organisation structurale. De plus, la capacité qu'a le noyau de se désassembler complètement, puis de se réassembler rapidement autour des chromosomes des cellules filles, est remarquable. Les principaux éléments de structure connus à ce jour sont les suivants;

l'enveloppe nucléaire (EN), les pores nucléaires, les nucléoles, la chromatine, la matrice nucléaire, le nucléosquelette et la lamina nucléaire.

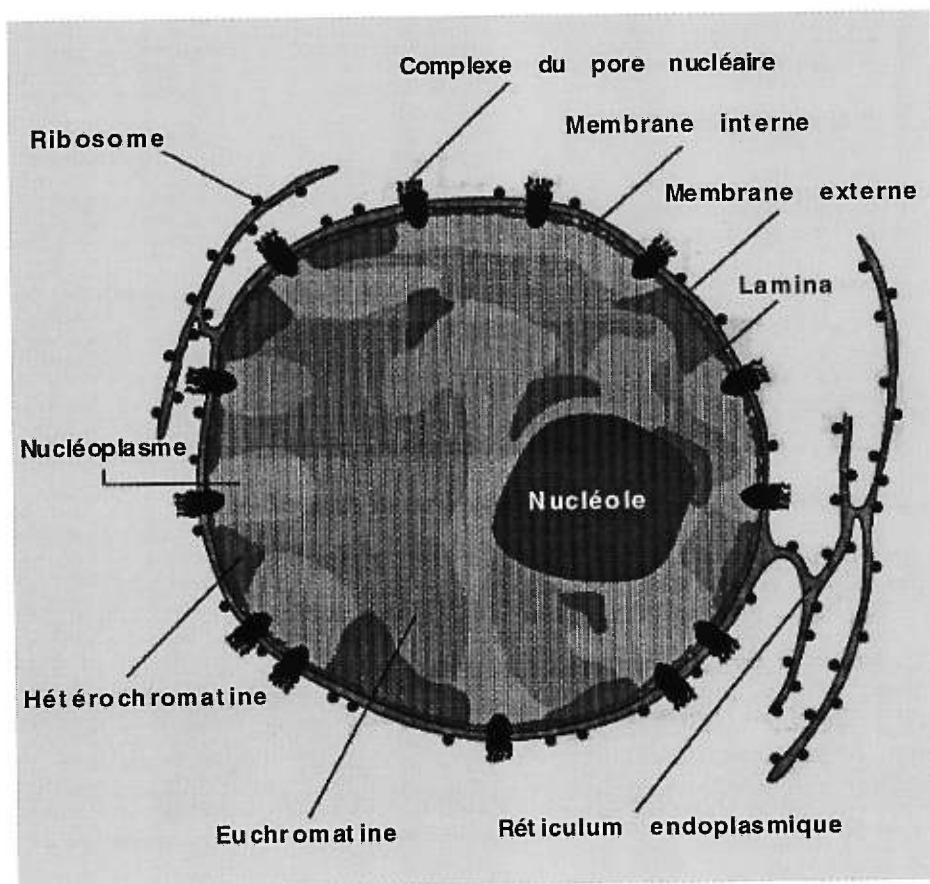


Figure 2 Structure du noyau en interphase.

Tirée de [Marshall et Wilson, 1997]

2.2.1 Enveloppe et pores nucléaires

L'enveloppe nucléaire est composée de deux membranes, l'une interne et l'autre externe, qui se rejoignent au niveau des pores nucléaires par une membrane spécialisée ou «membrane du pore». La membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique (RE), alors que la membrane interne et la «membrane du pore» contiennent des protéines spécifiques, qui ne sont pas détectées dans le RE [Georgatos et al., 1997 ; Yang et al., 1997a]. L'EN sépare la machinerie génétique de celle de la synthèse des protéines. La majeure partie de l'ARNm mature synthétisé dans le noyau

est transportée dans le cytoplasme pour servir à la synthèse protéique, alors que certaines protéines ayant des fonctions à effectuer au noyau sont synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans le noyau. Ce transport bidirectionnel de macromolécules est médié par les complexes des pores nucléaires (CPN) [Pante et Aebi, 1995a].

La structure des CPNs a été étudiée par plusieurs techniques de microscopie électronique (revues [Goldberg et Allen, 1996 ; Goldberg et al., 1997 ; Pante et Aebi, 1995a; 1995b]). Le CPN est intégré dans la membrane et dans les autres structures protéiques de l'enveloppe nucléaire. Le CPN a une masse importante (~ 125 megaDaltons) [Reichert et al., 1990] et est composé d'environ 100 protéines différentes [Rout et Blobel, 1993]. Cette structure complexe permet aux ions et aux petites molécules de diffuser à travers les canaux aqueux, mais les molécules de plus de 40

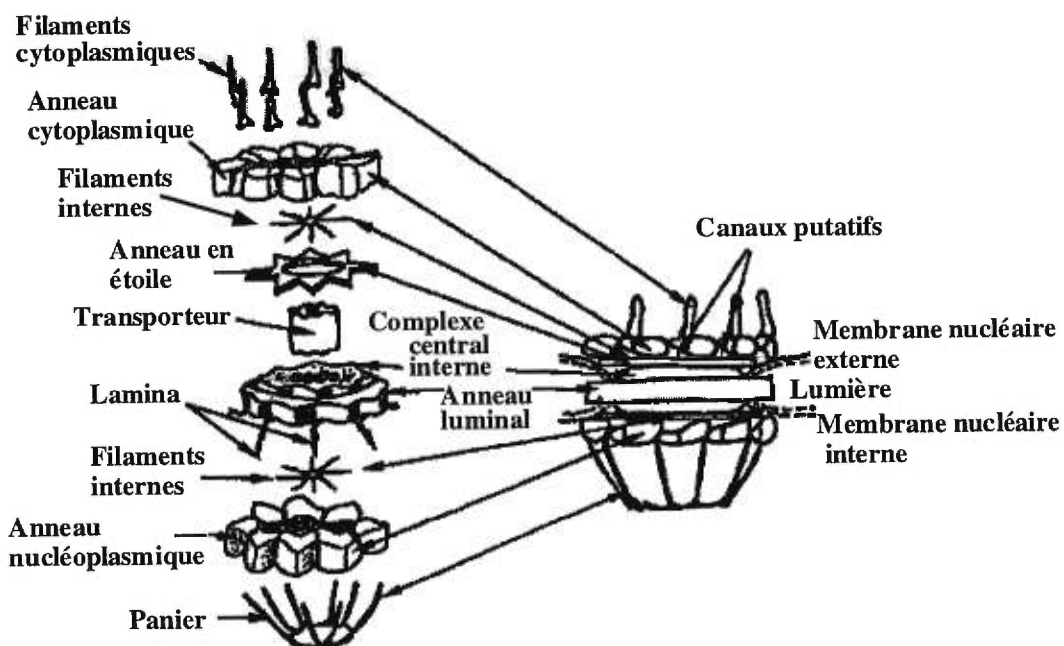


Figure 3 Modèle d'assemblage des différentes structures composant le CPN.

Diagramme illustrant les structures observées par FEISEM [Goldberg et Allen, 1996].

kDa ainsi que certaines protéines nucléaires plus petites, comme les histones, sont transportées à travers les pores nucléaires par des mécanismes de transport actif.

Les CPNs sont formés par l'assemblage de plusieurs sous-structures et seraient possiblement attachés à la lamina. Cependant, Goldberg et Allen ne peuvent, à ce jour, préciser si la lamina est directement attachée au complexe du «spoke ring» (complexe central), ou si les filaments ou branches qui relient la lamina à cette rondelle sont composés d'autres protéines. Les auteurs suggèrent cependant que la fonction de cet attachement serait plus important qu'un simple ancrage du pore nucléaire à la membrane nucléaire interne. Ils évoquent la possibilité que des perturbations de l'organisation de la lamina pourraient affecter la conformation du pore et, ainsi, sa fonction de transport.

2.2.2 Nucléole et chromatine

Le nucléole apparaît au microscope photonique comme une structure nucléaire solitaire ou multiple qui occupe une partie substantielle du noyau [Scheer et Weisenberger, 1994]. Il représente un compartiment nucléaire spécialisé dans la transcription des gènes ribosomiaux, la maturation de l'ARN ribosomal et l'assemblage des particules pré-ribosomales. Il contient toute la machinerie protéique et/ou enzymatique nécessaire à ces fonctions [Strouboulis et Wolffe, 1996].

Dans des conditions physiologiques, l'ADN génomique est enroulé en nucléosomes puis organisé dans une structure supramoléculaire. Il existe plusieurs «états de repliement» pour la chromatine : la fibre de 11 nm représentée par les «billes sur une ficelle», la fibre hélicoïdale de 30 nm et les boucles de chromatine qui sont des segments de 50-100 Kb d'ADN qui s'attacheraient à la matrice nucléaire. Pendant l'interphase, la chromatine se retrouve aussi sous une forme condensée appelée hétérochromatine ou sous une forme plus dispersée, l'euchromatine [Georgatos, 1994]. Le génome se retrouverait ainsi dans une structure tridimensionnelle, qui serait

particulière à l'état de différenciation de chaque cellule car le patron des domaines d'euchromatine et d'hétérochromatine, ainsi que des sites d'attachement à la matrice nucléaire varient au cours de l'ontogenèse [Blobel, 1985].

L'hétérochromatine est considérée inactive au niveau de la transcription. Elle se retrouve en bande irrégulière à la périphérie nucléaire, autour des nucléoles et en petits amas dans le nucléoplasme. L'euchromatine représente environ 10 % de la chromatine [Spector, 1993]. La chromatine serait potentiellement mobile, se déplaçant vers les foyers de réplication pendant la phase S. Ces foyers représenteraient un des exemples les plus frappants de compartimentalisation des fonctions à l'intérieur du noyau ([Strouboulis et Wolffe, 1996] et les références citées).

2.2.3 Matrice nucléaire et nucléosquelette

Le terme matrice nucléaire fut d'abord utilisé pour désigner les composantes structurales du noyau qui demeurent insolubles après des traitements séquentiels avec des détergents non-ioniques, des nucléases, puis des tampons à forte et faible concentration de sels [Neves et al., 1993]. Berezney et Coffey [1974] furent les premiers à développer la méthode pour l'isoler. La matrice retient la forme du noyau et est composée de résidus de l'enveloppe nucléaire, de la lamina, des CPNs, des nucléoles et d'un réseau de fibres granuleuses qui s'étendent du nucléole à la lamina [Belgrader et al., 1991 ; Neves et al., 1993]. Ces sous-structures sont normalement masquées par la forte concentration de chromatine présente dans les noyaux non-extraits. Plusieurs études ont conduit à la conclusion que la matrice nucléaire était impliquée dans l'organisation de la chromatine, la réplication de l'ADN, la transcription, la maturation et le transport de l'ARN ([Belgrader et al., 1991 ; Neves et al., 1993] et les références citées).

Le terme matrice nucléaire est aujourd'hui aussi utilisé pour décrire l'ensemble des éléments structuraux du noyau. La matrice contribue à l'organisation structurale et fonctionnelle de l'ADN. La comparaison de préparations de matrice ont permis d'observer que la composition protéique de la matrice nucléaire varie de façon spécifique selon le type cellulaire [Fey et Penman, 1988 ; Getzenberg et al., 1991]. Ainsi, des différences dans la composition des matrices nucléaires de cellules de cancers du sein et de cellules normales ont permis de supposer que les protéines de la matrice pourraient servir de marqueurs biologiques de cette pathologie [Khanuja et al., 1993].

Les concentrations d'ADN, d'ARN et de protéines dans le noyau étant très élevées, la possibilité d'agrégation de certaines de ces molécules provoquée par des modifications de la force ionique ne peut être écartée [Jackson et Cook, 1988]. Par conséquent, les différences observées dans la composition des matrices nucléaires en fonction des méthodes d'extraction utilisées pourraient être artéfactuelles. Jackson et Cook ont développé une méthode d'isolement de la chromatine utilisant des concentrations «physiologiques» de sels. Les cellules sont encapsulées dans des billes d'agarose, puis les membranes sont solubilisées par un tampon physiologique contenant un détergent, le Triton X-100. Dans ces conditions, la structure globale du noyau est préservée ainsi que l'intégrité de l'ADN et les fonctions de synthèse d'ARN et d'ADN ont lieu à des taux similaires à ceux qui sont observés *in vivo*. Pour visualiser le nucléosquelette, la chromatine est fragmentée à l'aide de nucléases puis enlevée par électrophorèse. Le nucléosquelette ainsi obtenu présente des ramifications qui s'étendent à travers tout le noyau. Il est composé de filaments d'une largeur de 10 nm ayant des répétitions axiales de 23 nm, une caractéristique des filaments intermédiaires. Le même groupe a par la suite montré que des «usines» de réplication seraient attachées à ce nucléosquelette [Hozak et al., 1993]. Des travaux récents de Zhang et al. [1996a] ont aussi permis de montrer, à l'aide de pronoyaux assemblés à

partir d'extraits d'oeufs de *Xenopus*, la présence de filaments à la frontière nucléaire (la lamina) ainsi que des filaments composant une matrice nucléaire interne. Ces auteurs ont proposé que ces deux réseaux de filaments seraient nécessaires pour maintenir à l'intérieur du noyau l'intégrité des tensions décrite par D.E. Ingber, ainsi que pour soutenir la réplication de l'ADN.

2.2.4 Actine nucléaire

L'actine, qui est le constituant majeur des microfilaments, joue un rôle important dans la morphologie, la motilité et la structure des cellules (voir section 2.1.2). La présence d'actine dans le noyau a été observée pour la première fois en 1963 [Ohnishi et al., 1963]. Depuis ce temps, plusieurs laboratoires ont confirmé la présence abondante d'actine ainsi que de protéines liant l'actine dans le noyau (voir [Amankwah et De Boni, 1994] et les références citées). Malgré ces travaux, la présence de l'actine dans le noyau a été longtemps controversée. Certains supposent que la présence d'actine dans le noyau serait due à une contamination provenant du cytoplasme. Goldstein et al. [1977b] ont démontré que l'inverse était aussi possible et que l'actine nucléaire pouvait être perdue au cours de l'isolement des noyaux. Ils ont aussi démontré que l'actine était mieux retenue par les noyaux dont la chromatine était condensée [Goldstein et al., 1977a].

Lestourgeon et al. [1975] ont isolé de l'actine et de la myosine nucléaires avec une troisième protéine qui lie l'actomyosine en présence de Mg^{2+} . Lorsque les cellules devenaient quiescentes, la quantité de cette protéine diminuait alors que la quantité d'actine nucléaire augmentait de plusieurs fois. En même temps, il y avait condensation et inactivation de la chromatine. Les auteurs ont suggéré que les protéines contractiles seraient impliquées dans les modifications structurales de la chromatine et dans la régulation de la prolifération cellulaire. Rungger-Brandle et al. [1979] ont pour leur

part montré que l'injection d'anticorps anti-actine dans les oocytes de *Xenopus* bloquait la condensation des chromosomes. Une étude subséquente a démontré que la microinjection de protéines liant l'actine ou d'anticorps anti-actine bloquait la transcription des «lampbrush chromosomes» [Scheer et al., 1984].

Une autre raison alimentant la controverse entourant la présence d'actine nucléaire était la difficulté de la détecter *in vivo*. Comme pour plusieurs autres antigènes nucléaires, la densité de la chromatine peut en bloquer l'accessibilité. Sauman et Berry [1994] ont contourné ce problème en traitant des cellules à la DNase I ou à la nucléase micrococcalle : suite à ces traitements, ils ont pu détecter l'actine nucléaire à l'aide d'anticorps ou de phalloïdine. Ils ont aussi montré que l'actine s'associait à la RNA polymérase II dans les chromosomes polytènes. Un autre argument à l'encontre de la contamination des noyaux par l'actine cytoplasmique a été la mise en évidence d'une isoforme d'actine nucléaire différente de l'actine cytoplasmique [Bremer et al., 1981 ; Kumar et al., 1984].

Des travaux d'immunocytochimie à l'aide de la microscopie confocale et électronique ont permis de localiser l'actine et la myosine dans les noyaux de neurones DRG (dorsal root ganglion) et dans des cellules PC-12 [Milankov et De Boni, 1993]. Il a aussi été montré que l'actine colocalisait avec les snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein) dans les cellules neuronales [Sahlas et al., 1993] et que le noyau de ces cellules contenait de l'actine de forme F [Amankwah et De Boni, 1994]. Récemment, Parfenov et al. [1995] ont visualisé des changements dans la distribution des filaments d'actine, dans les noyaux d'oocytes de grenouille, en rapport avec leur stade fonctionnel. Ainsi, ils ont observé des filaments intranucléaires d'actine qui s'étendent des nucléoles et des chromosomes jusqu'à l'enveloppe nucléaire. Ces filaments sont présents au stade 3, stade au cours duquel les nucléoles se retrouvent en périphérie du noyau et les chromosomes au centre. Au stade 6, les chromosomes condensés se retrouvent au centre du noyau et ils sont entourés par les nucléoles. À ce

stade, les faisceaux d'actine sont aussi regroupés au centre du noyau. Enfin, Nowak et al. [1997] ont récemment mis en évidence la présence de la myosine I dans le noyau ainsi que sa colocalisation avec l'actine nucléaire. Ces auteurs ont suggéré que des moteurs moléculaires basés sur l'actine seraient présents dans le noyau et qu'ils pourraient jouer un rôle dans la transcription.

Malgré ces résultats, le rôle de l'actine nucléaire n'est pas encore élucidé. Cette protéine, qui est associée à la matrice et à la chromatine, est, avec la myosine, un excellent candidat pour promouvoir les mouvements contractiles de la structure nucléaire.

3 LA LAMINA NUCLÉAIRE.

La lamina nucléaire consiste principalement en un réseau filamenteux qui tapisse la membrane nucléaire interne de toutes les cellules eucaryotes, tout en étant interrompu au niveau des pores nucléaires (revue dans [Gerace et Burke, 1988 ; Nigg, 1992 ; Spector, 1993 ; Stick, 1995]). Ce réseau apparaît comme une couche de 30 à 100 nm d'épaisseur entre la membrane nucléaire interne et la chromatine [Gerace et al., 1984]. La microscopie électronique a permis de visualiser la lamina des oocytes de *Xenopus* comme un réseau presque orthogonal de filaments de 10 nm [Aebi et al., 1986]. La lamina est composée principalement de protéines nommées lamines. L'analyse de la structure des lamines a permis de les classer comme membres de la famille des FIs [Fisher et al., 1986 ; McKeon et al., 1986 ; Stick, 1988].

3.1 FILAMENTS INTERMÉDIAIRES NUCLÉAIRES

Les lamines forment le type V de la famille des FIs (voir section 2.1.3.1). Elles possèdent d'ailleurs un épitope qui est commun à tous les FIs [Lebel et Raymond,

1987]. Les différences principales entre les lamines et les autres protéines des FIs sont : la présence de 42 acides aminés (a.a.) supplémentaires dans le segment 1B du domaine en hélice- α , d'un signal de localisation nucléaire (SLN) (a.a. 417 à 422), d'un domaine acide ainsi que d'une boîte CaaX qui constitue un signal d'isoprénylation (détaillé au point 3.6) [Fisher et al., 1986 ; McKeon et al., 1986]. Dans le cas des lamines, la subdivision du segment 2 du domaine en hélice- α en segment 2A et 2B est moins prononcée que pour les filaments intermédiaires [Stick, 1995].

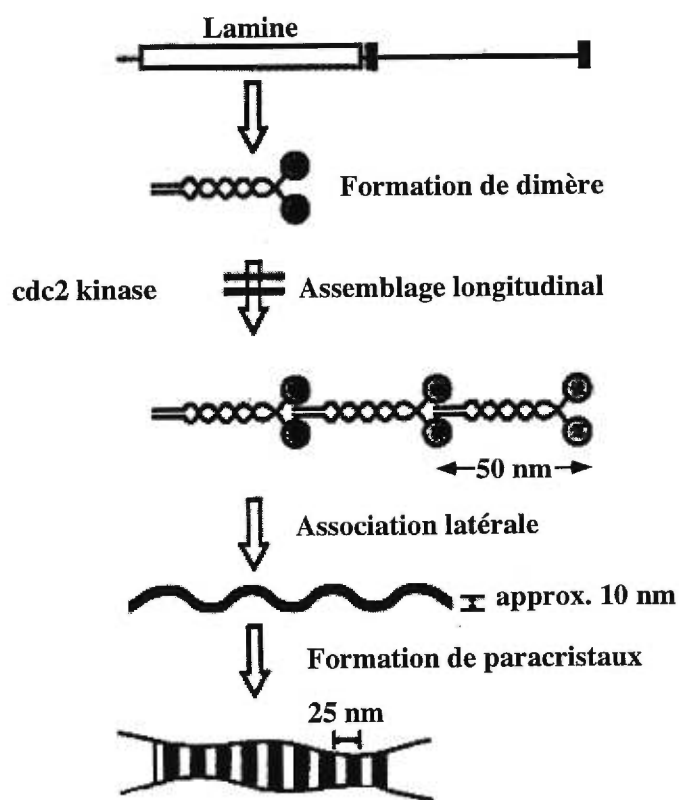


Figure 4 Modèle d'assemblage des lamines nucléaires

Résumé schématique des intermédiaires de l'assemblage des lamines [Nigg, 1992]. Les étapes de dimérisation, d'assemblage longitudinal puis d'association latérale sont illustrées.

L'assemblage des lamines *in vitro* diffère un peu de celui des protéines des FIs cytoplasmiques décrit au point 2.1.3.2. Les lamines forment d'abord des dimères avec deux domaines globulaires à une extrémité. Les dimères s'assemblent ensuite en tête à

queue pour former des polymères, au lieu de former des tétramères par interactions latérales. De plus, au lieu de former des filaments, les lamines ont tendance à former, dans certaines conditions, des faisceaux de filaments ou des paracristsaux qui ont une répétition axiale de 22 à 25 nm (voir fig 4) [Heitlinger et al., 1991 ; Moir et al., 1990 ; Peter et al., 1991]. Le domaine NH₂ serait essentiel à la formation des polymères en tête à queue *in vitro* [Heitlinger et al., 1992 ; Moir et al., 1991].

Récemment, Stuurman et al. [1996] ont démontré, en utilisant des mutations ponctuelles sur la lamine DM₀ de drosophile et le système de double hybride chez la levure, que certains résidus sont responsables des liaisons en tête à queue. Ces résidus sont situés aux extrémités du domaine central et sont très conservés chez tous les FIs. Une de ces mutations, R⁶⁴→C, est identique à une mutation de position homologue qui affecte la kératine 14 et qui cause l'épidermolyse bullosa simplex. La liaison en tête à queue serait donc équivalente à l'interaction longitudinale qui relie les FIs cytoplasmiques en filaments de 10 nm. Des travaux ont été effectués, en utilisant la lamine A de *Xenopus*, afin de comparer la capacité à former des paracristsaux de protéines contenant des mutations dans des régions spécifiques à certaines fonctions. Ainsi, la protéine de type sauvage et celle contenant une mutation au niveau de la boîte CaaX (C⁶⁶²→S) s'assemblaient en paracristsaux *in vitro*, alors que des mutations dans les domaines N- et C-terminaux, ainsi que la mutation (E³⁷⁷→K; E³⁸⁰→K), nuisaient ou inhibaient la formation de paracristsaux [Schmidt et Krohne, 1995]. Ces protéines mutantes formaient des précipités amorphes, des fibrilles de 2-3 nm ou une structure sphérique présentant une périodicité de 45-47 nm. Le comportement *in vivo* de ces protéines mutantes microinjectées ne correspond pas toujours à leur capacité de former des paracristsaux *in vitro* (voir section 3.6).

3.2 GÈNES DES LAMINES ET ÉVOLUTION

L'analyse de la structure des gènes des lamines et des filaments intermédiaires cytoplasmiques a conduit à l'hypothèse que les lamines nucléaires représenteraient l'ancêtre commun des FIs des invertébrés puis des vertébrés (voir fig 5) (revue dans [Stick, 1995]). La séquence d'événements ayant conduit à l'apparition des FIs des invertébrés est la suivante. Il y aurait eu l'ajout de deux nouveaux introns : un dans la région 1B de l'hélice- α et un vers la position du SLN, i.e. au début du domaine C-terminal. Simultanément, il y aurait eu perte de l'intron 2 des lamines, du SLN et de l'exon en C-terminal qui code pour la boîte CaaX avec le dernier intron des lamines.

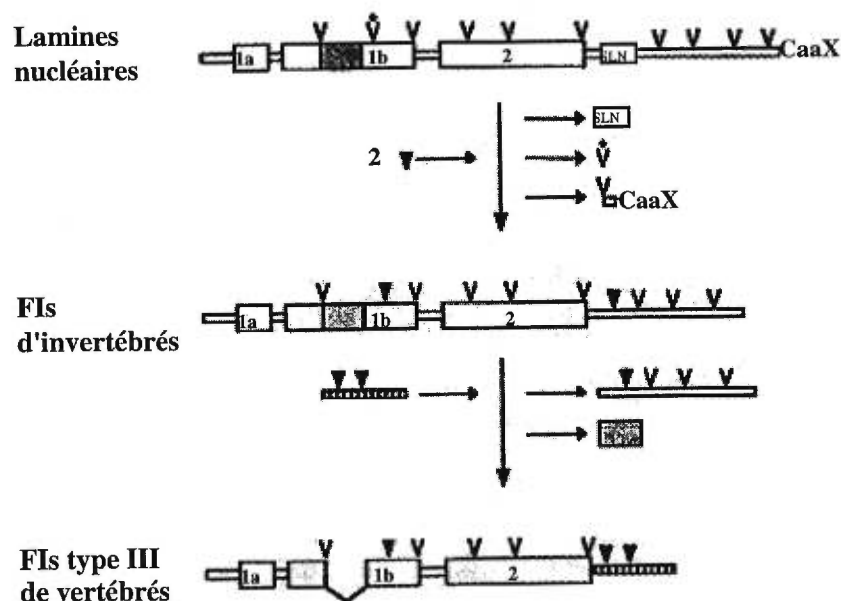


Figure 5 Modèle de l'évolution des gènes des FIs à partir du gène ancestral des lamines.

Les triangles ouverts représentent la position des introns communs, les triangles pleins représentent les nouveaux introns, la boîte ombragée représente la délétion de 42 a.a. et la boîte rayée, les nouveaux exons [Stick, 1995].

Les FIs des vertébrés ont été engendrés par une délétion supplémentaire de 42 a.a. dans le segment 1B du domaine en hélice- α et un remplacement de la queue C-terminale par

de nouveaux exons. Les domaines C-terminaux des différentes familles de FIs seraient dus à des modifications ou à des échanges dans ces derniers exons.

Le gène des lamines A/C humain a été cartographié au chromosome 1q21.3, celui de la lamine B₁ au chromosome 5q23.3-q31.1 [Kamat et al., 1993 ; Wydner et al., 1996] alors que le gène de la lamine B₂ serait localisé au chromosome 19p13.3 [Biamonti et al., 1992].

3.3 EXPRESSION DES LAMINES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA DIFFÉRENCIATION

Les lamines nucléaires sont présentes dans toutes les cellules des eucaryotes supérieurs [Gerace et Burke, 1988]. Les lamines, ou des protéines qui en sont proches, ont été détectées dans les cellules de pois [McNulty et Saunders, 1992] ainsi que dans les matrices nucléaires d'oignons [Minguez et Moreno Diaz de la Espina, 1993]. Elles seraient aussi présentes chez les levures [Georgatos et al., 1989], les protozoaires comme *Amoeba proteus* [Schmidt et al., 1995] et le nématode *Caenorhabditis elegans* [Riemer et al., 1993].

Tout comme les autres protéines des FIs, les lamines ont un patron d'expression qui varie au cours du développement et de la différenciation. Chez les vertébrés, il y a deux types de lamines : les types A et B. Cette classification est fonction de leur séquence, de leurs propriétés biochimiques ainsi que de leur distribution subcellulaire durant la mitose [Nigg, 1992]. Les lamines de type A ont un pI plutôt neutre (6.8 à 7.2), elles contiennent un groupement poly-histidine dans leur domaine C-terminal et se retrouvent sous forme soluble au cours de la mitose. Les lamines de type B ont un pI acide (5.5) et restent associées aux fragments d'enveloppe nucléaire pendant la mitose. Au moment de leur découverte dans les cellules somatiques différenciées, trois lamines principales, dont les poids moléculaires (PM) se situent entre 60 et 80 kDa, ont été identifiées. Elles ont été nommées lamines A, B et C en fonction de l'ordre décroissant

de leur PM [Gerace et Burke, 1988]. L'analyse de la structure des gènes de *Xenopus* suggère que les lamines de types B représenteraient le type ancestral de lamines, alors que le gène des lamines de type A serait apparu à la suite d'un échange d'exons [Stick, 1992]. Les lamines de type B sont exprimées dans toutes les cellules [Broers et al., 1997], alors que les lamines de type A apparaissent au cours du développement et de la différenciation, que ce soit chez les oiseaux [Lehner et al., 1987], les amphibiens [Benavente et al., 1985] ou les mammifères [Rober et al., 1989 ; Stewart et Burke, 1987]. Rober et al. [1989] ont suggéré que l'expression des lamines de type A aurait pour rôle de modifier la plasticité des cellules, afin de permettre la continuité du processus de développement. La présence de lamines de type A chez la drosophile n'a été détectée que récemment [Bossie et Sanders, 1993]. L'expression de cette lamine est aussi régulée au cours du développement [Riemer et al., 1995]. Une étude récente sur l'activation du gène de la lamine A, durant le développement du foie de rat, a conclu à une régulation transcriptionnelle de l'expression de la lamine A chez le fœtus [Hamid et al., 1996].

Chez les mammifères, les lamines de type B incluent la lamine B₁ et la lamine B₂ qui sont produites par deux gènes différents [Hoger et al., 1988 ; Hoger et al., 1990 ; Peter et al., 1989 ; Vorburger et al., 1989 ; Weber et al., 1990 ; Zewe et al., 1991]. Pour ce qui est des lamines de type A, elles comprennent les lamines A et C, qui sont issues du même gène par épissage alternatif [Fisher et al., 1986 ; Lin et Worman, 1993 ; McKeon et al., 1986].

Au cours des dernières années, de nouvelles lamines, ou de nouvelles isoformes de lamines ont été découvertes. L'expression de ces lamines est souvent associée à un type cellulaire spécifique. Par exemple, les lamines B₃ et C₂ sont des lamines spécifiques aux lignées germinales [Alsheimer et Benavente, 1996 ; Furukawa et Hotta, 1993 ; Furukawa et al., 1994 ; Smith et Benavente, 1992]. La lamine B₃ serait codée par le même locus que la lamine B₂, mais serait un produit d'épissage alternatif ayant

une polyadénylation différente [Furukawa et Hotta, 1993]. L'analyse de la structure du gène de la lamine A de souris a permis d'identifier des sites de début de transcription pour les lamines A/C et C₂, ce qui suggère que le locus serait sous le contrôle de deux promoteurs différents [Nakajima et Abe, 1995]. Les travaux de Alsheimer et Benavente [1996] sur l'expression de la lamine C₂ chez les mammifères suggèrent aussi que le contrôle de l'expression de la lamine C₂ serait transcriptionnel.

Un autre produit d'épissage alternatif du gène de la lamine A a été découvert dans une lignée d'adénocarcinome de poumon [Machiels et al., 1996]. Cette protéine a une délétion de 30 a.a. provoquée par une délétion de la partie 5' de l'exon 10. L'ARN de cette lamine, nommée lamine AΔ10, a été détecté dans une variété de lignées cellulaires incluant des adénocarcinomes, des «Non Small Cell Lung Cancer» (N-SCLC) neuroendocrines, des carcinomes de poumons à grosses cellules non-différenciées, des carcinomes de seins, etc. ainsi que sur des spécimens humains d'adénocarcinomes de poumons et de colon normal. Ces observations permettent de penser que cette lamine AΔ10 serait présente dans plusieurs types de tissus.

Plusieurs études de l'expression des lamines relativement à des pathologies ont été effectuées [Ausma et al., 1996 ; Cance et al., 1992 ; Kaufmann, 1992 ; Kaufmann et al., 1991]. Ces études ont confirmé l'expression différentielle des lamines en fonction de la différenciation cellulaire. Par exemple, des cellules provenant de biopsies de patients souffrant de «chronic hibernating myocardium» ont été comparées à des cellules ayant une cinétique normale. Ces cellules «en hibernation» semblaient être dans un état de dédifférenciation. Il ressort que 80 % des cellules «en hibernation» n'exprimaient pas les lamines de type A. De plus, dans le 20 % des cellules qui exprimaient les lamines de type A, ces dernières se retrouvaient en amas dans le noyau [Ausma et al., 1996]. Il a aussi été observé que les lamines A et C étaient présentes dans les lignées cellulaires provenant de N-SCLC mais que leur expression était diminuée dans les lignées provenant de SCLC [Kaufmann et al., 1991]. Lorsque

l'expression de v-ras^H a été forcée dans la lignée de SCLC NCI-H249 pour induire leur conversion en N-SCLC, le niveau de lamines A/C a augmenté d'un facteur de 10 comparativement à la lignée parentale. Il y a eu aussi augmentation de l'expression de la vimentine et acquisition de la capacité d'adhérence à la boîte de Pétri, alors que l'expression de la lamine B n'a pas semblé être modifiée. Ces résultats indiquent que les effecteurs de la voie de signalisation de v-ras^H pourraient affecter l'expression du gène de la lamine A mais pas celle du gène de la lamine B; d'où l'hypothèse suggérée par les auteurs que l'expression des deux types de lamines serait régulée par des voies de signalisation différentes. Les auteurs signalent l'utilité des lamines comme marqueurs des SCLC vs N-SCLC. Ces résultats sur l'expression différentielle des lamines de type A, dans les cellules de cancer de poumons humains, ont été confirmés par une étude subséquente effectuée sur des lignées cellulaires, ainsi que sur des tumeurs solides [Broers et al., 1993]. Cette dernière étude a aussi démontrée une localisation aberrante des lamines de type A dans les N-SCLCs. En résumé, les lamines de types A sont incapables d'effectuer leur fonction dans les cellules SCLC ou N-SCLC soit parce qu'elles sont absentes, soit parce qu'elles ne sont pas localisées adéquatement.

Une étude récente, faite sur des tissus humains, a mis en évidence que les lamines de type A étaient exprimées à des niveaux élevés dans les cellules différenciées, alors que leur expression était réduite dans les cellules d'épithélium peu différenciées ou en prolifération [Broers et al., 1997]. Cette relation inverse entre l'expression des lamines de type A et la prolifération cellulaire avait aussi été évoquée lorsqu'il fut découvert que la statine, qui est un antigène (Ag) abondant dans les cellules en arrêt de croissance [Wang, 1985 ; Wang, 1989], correspondait en fait aux lamines A et C [Coates et al., 1996]. De plus, il a été proposé que le niveau d'expression de cet Ag, inversement proportionnel au taux de prolifération des tumeurs, pourrait servir de marqueur pronostique [Tsanaclis et al., 1991]. L'hypothèse la plus simple pour expliquer ces

différentes observations est que les lamines de types A, qui apparaissent au moment de la différenciation cellulaire, contribueraient en augmentant la rigidité de la structure nucléaire à induire l'expression de certains gènes spécifiques. Cette rigidité structurale aurait un effet négatif sur la capacité des cellules à proliférer. La perte de cette rigidité dans les cellules cancéreuses décrites précédemment leur donnerait donc un avantage prolifératif.

Récemment, le modèle des fibroblastes Swiss 3T3 a été utilisé pour démontrer une augmentation de la quantité des lamines A/C lorsque les cellules devenaient quiescentes suite à une carence en sérum, et une diminution rapide de l'expression de ces protéines lorsque les cellules étaient restimulées à proliférer [Pugh et al., 1997]. Fait surprenant, la quantité maximale de lamine A observée dans les cellules quiescentes était atteinte malgré une diminution de la quantité d'ARNm par rapport aux cellules en prolifération. Pour expliquer ces observations, il faut supposer que les lamines sont des protéines très stables et que, lors de la quiescence, le taux de renouvellement des lamines A/C et de leur ARNm est très faible. Par ailleurs, des observations différentes ont été faites récemment sur des cultures exponentielles versus quiescentes de fibroblastes de derme humain en utilisant une nouvelle panoplie d'anticorps monoclonaux reconnaissant différents épitopes des lamines A et/ou C [Dyer et al., 1997]. Aucun changement dans l'expression des lamines A et C selon l'état de prolifération des cellules n'a été détecté par buvardage immunologique. Par contre, en immunofluorescence, alors que certains de ces anticorps coloraient fortement aussi bien les noyaux des cellules en croissance exponentielle que quiescentes, d'autres réagissaient fortement avec les noyaux des cellules quiescentes et faiblement avec les noyaux des cellules en prolifération. Ces observations ont amené les auteurs à démontrer que la faiblesse de la coloration observée dans les cellules en prolifération était due à des modifications de la disponibilité des épitopes et à suggérer que des réarrangements des filaments de lamines de type A qui se produisent lorsque les cellules progressent de la quiescence à l'état

prolifératif, conduisent à des changements dans l'association des lamines avec la chromatine ou d'autres protéines nucléaires.

Donc, bien que les auteurs des deux études s'entendent sur le fait que le passage de l'état de croissance à l'état de repos s'accompagne de changements dans la lamina, ils sont en désaccord sur la nature de ces changements. Les premiers l'attribuent à des modifications de la composition de cette structure (ratio lamines A/C : lamines B) alors que les seconds l'attribuent principalement à des changements d'interactions des lamines de type A avec d'autres éléments nucléaires. L'étude de Pugh et al. [1997] n'apporte aucun élément expliquant l'apparente disparition des lamines et aucun produit de dégradation spécifique n'apparaît sur leurs buvardages immunologiques. Une information plus précise à ce sujet pourrait être obtenue par des marquages métaboliques. D'autres études seront aussi nécessaires pour déterminer si ces divergences sont attribuables à des différences de système cellulaire ou d'anticorps utilisés.

Lorsque des fibroblastes de rats (3Y1) ont été transformées par v-src, il y a eu suppression de l'expression de la lamine A par rapport à la lignée parentale. Cette diminution n'a pas été observée dans les cellules transformées par v-mos, SV-40 et v-ras^H [Ozaki et Sakiyama, 1992]. Cette dernière étude ne mentionne pas si, dans les fibroblastes 3Y1, la transformation par v-ras^H augmentait le niveau d'ARN de la lamine A, comme c'est le cas lorsque les cellules SCLC sont converties en N-SCLC par l'expression de v-ras^H [Kaufmann et al., 1991]. Ces observations sur la suppression, le maintien ou l'augmentation de l'expression des lamines de type A, au cours de la transformation par différents oncogènes, ne permettent pas de relier la lamine A au processus de transformation cellulaire.

L'expression des lamines dans les cellules de carcinome embryonnaire (CE) a aussi été étudiée. Les cellules de carcinome, P19 et F9, n'expriment que les lamines de type B, alors que les lamines de type A apparaissent après l'induction de la différenciation

[Lebel et al., 1987 ; Stewart et Burke, 1987]. Les travaux de Lanoix et al. [1992], dans les cellules de CE P19, ont montré un faible niveau d'ARNm de la lamine A dans les cellules avant traitement par un inducteur de différenciation. Le niveau de lamine A augmentait de plusieurs fois dans les cellules induites alors que le taux de transcription se maintenait, ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle. Cependant, le groupe de Mattia et al. [1992] n'a pas trouvé d'ARNm de lamine A dans les cellules P19 et F9 avant induction de la différenciation et a suggéré que le contrôle de l'expression de la lamine A serait sous contrôle transcriptionnel.

L'expression forcée des lamines de type A chez les cellules de CE de souris F9 ou P19 n'a pas produit d'effet marqué sur le processus de différenciation. Il a été démontré que la transfection transitoire des lamines A et C permettait leur expression, leur intégration dans la lamina et leur distribution aux cellules filles suite à la mitose [Collard et Raymond, 1990 ; Horton et al., 1992]. Cependant, la lamine C a été intégrée dans la lamina moins rapidement que la lamine A [Horton et al., 1992]. Par la suite, Peter et Nigg [1991] ont transfecté la lamine A dans des cellules P19 et ont montré que cette expression ectopique n'induisait pas la différenciation. De plus, sous l'effet de l'acide rétinoïque, ces cellules transfectées se différenciaient normalement. Les auteurs ont conclu que l'expression des lamines de type A ne suffisait pas à induire la différenciation et ont suggéré que d'autres événements moléculaires seraient nécessaires pour que les lamines de type A jouent leur rôle dans le processus de différenciation.

Les cellules hématopoïétiques n'expriment généralement que les lamines de type B. Cependant, les monocytes humains qui se différencient en macrophages expriment alors aussi les lamines A/C [Rober et al., 1990]. Les cellules HL-60 sont des cellules de leucémie myéloïde qui expriment la lamine B et dont l'expression des lamines de type A est acquise lors de l'induction de la différenciation [Paulin-Levasseur et Julien, 1992 ; Paulin-Levasseur et al., 1988 ; Rius et al., 1993]. Les travaux de Collard et al.

[1992] ont permis d'observer un «cap» de lamine A dans le noyau des cellules HL-60 non-différenciées alors que les lamines B et C étaient localisées dans la lamina. Ce «cap» se redistribuait lors de la différenciation induite par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) pour intégrer la lamina. Cette redistribution était réversible si les cellules ne se différençaient pas totalement. Les auteurs ont suggéré que cette redistribution de la lamine A correspondrait à la première étape dans le processus de différenciation de ces cellules et que la lamine A aurait par conséquent un rôle à jouer dans la différenciation cellulaire.

En résumé, toutes les cellules nucléées contiennent au moins une lamine de type B et les lamines de type A apparaissent au cours du développement et de la différenciation. Les lamines de type A s'accumuleraient à un niveau maximum lorsque les cellules sont quiescentes et se réorganiseraient rapidement lors de l'induction de la prolifération. Le contrôle de l'expression des lamines de type A serait transcriptionnel et possiblement post-transcriptionnel dans certains systèmes. L'expression de ces lamines est perturbée dans certains types de cancer et pourrait éventuellement servir de marqueur pronostique. Le rôle des lamines de type A dans la différenciation n'a cependant pas encore été élucidé.

3.4 LA PHOSPHORYLATION DES LAMINES

Les lamines nucléaires sont des protéines qui sont hyperphosphorylées durant la mitose [Burke et Gerace, 1986 ; Dessev et al., 1988 ; Gerace et Blobel, 1980]. Cette observation porte à croire que le désassemblage des lamines et de l'enveloppe nucléaire serait provoqué par la phosphorylation. Des sites de phosphorylation de la lamine C humaine recombinante ont été identifiés *in vitro* [Ward et Kirschner, 1990]. Dans un extrait d'oeuf de grenouille, l'ajout de MPF (maturation-promoting factor), dont la sous-unité de 32 kDa est homologue à la protéine kinase p34cdc2, induit la mitose et le

désassemblage des filaments de lamines recombinantes. Quatre sites de phosphorylation ont ainsi été identifiés : les S²², S⁴⁰⁴ et S⁴⁰⁶ seraient phosphorylées en interphase et à la mitose alors que la S³⁹² est phosphorylée spécifiquement à la mitose. Les sites S²² et S³⁹² sont localisés symétriquement de part et d'autre du domaine de dimérisation.

Le rôle de ces deux sites de phosphorylation a été étudié à l'aide de mutations ponctuelles sur l'ADNc de la lamine A humaine et de transfections dans des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) [Heald et McKeon, 1990]. La mutation S³⁹²→I seule laissait un phénotype similaire au type sauvage alors que la mutation de S²²→A seule perturbait le désassemblage dans 35 % des cellules observées. La double mutation S²²→A/S³⁹²→I bloquait le désassemblage de la lamina dans la majorité des cellules. Comme la S²² est phosphorylée en interphase et en mitose, les auteurs ont suggéré que c'est la phosphorylation supplémentaire de la S³⁹² qui conduirait au désassemblage. Les autres sites pourraient servir à permettre des désassemblages plus localisés pour l'intégration de nouvelles lamines et/ou à modifier des interactions de la lamine A avec d'autres composantes cellulaires.

Les sites de phosphorylation de la lamine C isolée à partir de cellules d'ascite de tumeurs de Ehrlich en interphase ont aussi été analysés [Eggert et al., 1991]. Les sites S³⁹² et S⁴⁰⁹ seraient partiellement phosphorylés en interphase et possiblement le site S⁴⁰⁷. Après une phosphorylation *in vitro* par la cdc2, les sites S³⁹⁰ et S³⁹² avaient une augmentation de phosphorylation. Dans ces essais, la S⁵⁷² était phosphorylée par la PKC (protéine kinase C) alors que le peptide correspondant aux acides aminés 1 à 32 était phosphorylé par la cdc2, la PKC ainsi que par la PKA (protéine kinase A) sur un site qui reste à déterminer plus précisément.

Dans un essai pour identifier des protéines liant l'ADN double brin en réponse à l'insuline dans des adipocytes, sept protéines ont été observées [Csermely et Kahn, 1992]. Ces protéines incluent les lamines A et C et elles seraient phosphorylées sur des

sérines. Dans des cellules de pois, une kinase de type CKII (caséine kinase II), qui serait associée à la matrice nucléaire, phosphorylerait une protéine qui serait l'homologue de la lamine A [Li et Roux, 1992]. Les auteurs ont suggéré que cette activité pourrait être importante comme point de contrôle de la prolifération cellulaire. Le modèle des HL-60 a été utilisé pour étudier la phosphorylation de la lamine B au moment de la différenciation [Martell et al., 1992]. Après induction de la différenciation par la 1,25-Dihydroxyvitamine D₃, la lamine B serait phosphorylée par la PKC et peut être par d'autres kinases. Hennekes et al. [1993] ont analysé les sites potentiels de phosphorylation de la lamine B₁ par la PKC. *In vivo*, S⁴⁰⁰ et S⁴⁰⁴ étaient phosphorylées en interphase alors que S⁴¹⁰ et S⁴¹¹ le devenaient lorsque la PKC était activée par traitement des cellules avec un phorbol ester (PMA). Ces derniers sites sont à proximité du SLN (414-419) ce qui a permis de suggérer une influence sur le transport de la protéine. Hennekes et al. [1993] ont observé que la phosphorylation par la PKC interférait avec le transport au noyau dans des cellules perméabilisées. De plus, la stimulation au PMA réduisait la vitesse de transport de la lamine B₂ *in vivo*. Les auteurs ont suggéré que le contrôle du transport par la phosphorylation aurait un rôle important à jouer dans les voies de signalisation entre le cytoplasme et le noyau. L'analyse *in vivo* et *in vitro* des sites de phosphorylation des lamines A et C de souris a conduit à plusieurs conclusions. Les sites impliqués dans la division cellulaire et phosphorylés par la cdc2 seraient S³⁹², S²² et T¹⁹ [Eggert et al., 1993]. Lors de l'interphase, les S^{403/404} situées près du SLN seraient phosphorylées par la PKC ainsi que la S⁵²⁵ qui est située dans le domaine C-terminal. Les expériences de mutations et de transfections sur les sites S³⁹², S²² et T¹⁹ ont conduit aux mêmes conclusions que celles obtenues par Heald et McKeon [1990]. Les mutations des S^{403/404} inhibaient le transport au noyau alors que celles des S^{406/407} restaient sans effet apparent [Haas et Jost, 1993 ; Leukel et Jost, 1995]. La lamine A ayant une mutation S⁵²⁵→G n'intégrait pas correctement la lamina mais son comportement au moment de la mitose n'était pas

affecté. L'assemblage de cette protéine en lamina était discontinu. Les auteurs ont suggéré que la phosphorylation par la PKC aurait un rôle à jouer dans l'assemblage en lamina ou que le problème de ce mutant résiderait dans l'empêchement d'une liaison avec une autre protéine et/ou dans la distorsion d'une interaction lamine-chromatine. Ce contact lamine-chromatine ne serait observé normalement que sur une portion de la lamina [Paddy et al., 1990]. Suite à l'observation de phosphorylation de la lamine B₂ dans la phase S du cycle cellulaire, certains auteurs ont suggéré que cette phosphorylation pourrait être impliquée dans le mécanisme qui permet à ce type de lamine de se rendre dans les sites de réplication de l'ADN [Kill et Hutchison, 1995]. Les kinases impliquées dans ce processus hypothétique n'ont pas été identifiées. Pour sa part, Stuurman [1997] a suggéré que le désassemblage des lamines *in vivo* pourrait se produire par différents mécanismes. Il a démontré, en utilisant des fragments de lamine de drosophile Dm₀, que l'association en tête à queue peut être inhibée par la phosphorylation de la S⁵⁰ par la PKA *in vitro*, de la même façon que par la phosphorylation de la S⁴² par la cdc2. Des travaux sur le récepteur de la lamine B (décrit au point 3.7) permettent de croire que la phosphorylation de ce récepteur serait aussi impliquée dans le désassemblage de l'enveloppe nucléaire durant la mitose [Courvalin et al., 1992 ; Nikolakaki et al., 1997].

3.5 PROCESSUS DE MATURATION DES LAMINES

Les lamines possèdent un SLN qui permet leur transport au noyau. Ce signal est similaire à celui de l'antigène grand T de SV-40 qui est le premier à avoir été identifié et caractérisé [Loewinger et McKeon, 1988].

SV-40 (grand T)	PTKKKRKVE	
Lamine A/C hum	SVTKKRKLE	(a.a. 414 à 422)
Lamine B hum	GKRKRVDVE	(a.a. 414 à 422)

Figure 6 Comparaison des SLNs des lamines humaines et de l'antigène grand T de SV-40.

La transfection de lamine A ayant des mutations dans la région 414-422 a permis de démontrer son importance pour le transport au noyau [Loewinger et McKeon, 1988 ; Lourim et Lin, 1992]. La cotransfection de mutants avec la protéine de type sauvage a cependant permis de restaurer la localisation de la protéine mutante. Ce résultat a permis de supposer une oligomérisation posttraductionnelle précédant l'entrée au noyau [Loewinger et McKeon, 1988]. Par la suite, il a été démontré que la fusion des a.a. 415-423 à une protéine cytoplasmique était suffisante pour la diriger au noyau. La mutation $K^{417} \rightarrow L$ a complètement aboli le transport au noyau de la protéine de fusion [Frangioni et Neel, 1993]. Le transport au noyau serait aussi contrôlé par la phosphorylation (voir section 3.4).

Les lamines A et C sont produites par l'épissage alternatif d'un même gène [Lin et Worman, 1993]. La lamine C dont le PM est d'environ 62 kDa est associée à un ARNm de 1.9 à 2.3 kb alors que l'ARNm de la lamine A serait de 2.5 à 3.1 kb [Laliberte et al., 1984]. Cet ARNm donne naissance à une protéine de 74 kDa alors que dans les matrices nucléaires le PM de la lamine A est de 72 kDa, suggérant que la lamine A serait synthétisée sous la forme d'un précurseur. Les lamines A et C ont en commun les 566 a.a. en N-terminal et diffèrent par leur extrémité C-terminale respective de 98 et 6 a.a. (voir fig. 7) [Fisher et al., 1986].

Les lamines de type B ainsi que la lamine A possèdent à leur extrémité carboxy-terminale une boîte CaaX dans laquelle C=Cys, A=a.a. aliphatique et X=n'importe quel a.a. Ce motif térapeptidique donne lieu à des modifications post-traductionnelles. La cystéine est d'abord isoprénylée par un farnésyl, dans le cas des lamines [Farnsworth et al., 1989 ; Lutz et al., 1992]; il y a par la suite coupure protéolytique des 3 a.a. aaX, puis carboxy-méthylation de la cystéine (revue dans [Sinensky et al., 1994a]).

La fonction du groupement farnésyl sur les lamines A et B n'a pas été totalement éclaircie. L'isoprénylation et la carboxyméthylation augmentent l'hydrophobicité et cette caractéristique pourrait expliquer l'augmentation de l'affinité pour la membrane.

METPSQRRAT RSGAQASSTP LSPTRITRLO EKEDLOELND RLAVYIDRVR
SLETENAGLR LRITSEEVV SREVSGIKAA YEAE LGDARK TLDSVAKERA 100
RLQLELSKVR EEFKELKARN TKKEGDLIAA QARLKDLEAL LNSKEAALST
ALSEKRTLEG ELHDLRGOVA KLEAALGEAK KQLQDEMLRR VDAENRLQTM 200
KEELDFQKNI YSEELRETKR RHETRLVEID NGKQREFESR LADALQELRA
QHEDQVEQYK KELEKTYSAK LDNARQSAER NSNLVGAAHE ELQQSRIRID 300
SLSAQLSLOLQ KQLAAKEAKL RDLEDSLARE RDTSRLLAE KEREMAEMRA
RMQQQLDEYQ ELLDIKLALD MEIHAYRKL EGEEERLRLS PSPTSQRSRG 400
 RASSHSSQTQ GGSVTKKRK...LESTESRSSF SQHARTSGRV AVEEVDEEGK
 FVRLRNKSNE DQSMGNWQIK RQNGDDPLLT YRFPPKF'TLK AGQVVTIWAA 500
 GAGATHSPPT DLVWKAQNTW GCGNSLRTAL INSTGEEVAM RKLVRSVTVV
EDDEDEDGDD LLHHHH 566 **Fin de la région commune**
 VSGSRR 572 **C-terminal de la lamine C**
 GSHC SSSGDPAEYN LRSRTVLCGT CGQPADKASA 600
 SGSGAQVGGP ISSGSSASSV TVTRSYRSVG GSGGGSFGDN LVTRSY↓LLGN
 SSPRTQSPQN **CSIM** 664 **C-terminal de la lamine A**

Figure 7 Séquence des lamines A/C humaines.

Les lamines A et C ont en commun les 566 acides aminés en N-terminal et diffèrent uniquement par leur région C-terminale de 98 et 6 a.a. Les régions de dimérisation sont doublement soulignées. Le SLN est souligné en pointillés. Les acides aminés soulignés à la fin de la région commune aux lamines A/C représentent la région acide et le polyhistidine. La boîte CaaX est en caractère gras Les sites de phosphorylation importants sont en caractères gras et soulignés. La ↓ située après la Y⁶⁴⁶ représente le site de coupure de la lamine A mature.

L'isoprénylation pourrait aussi servir à consolider des interactions protéines-protéines (revue dans [Clarke, 1992]). La lamine B conserve son groupement farnésyl alors que la lamine A subit une coupure protéolytique supplémentaire de 15 a.a. [Dagenais et al., 1985 ; Weber et al., 1989]. La lamine A mature a donc 18 a.a. de moins que son précurseur. Le rôle présumé de cette isoprénylation est de favoriser l'association avec la membrane nucléaire. Cette hypothèse est appuyée par l'observation que les lamines de type A sont solubles au moment de la mitose alors que les lamines de type B restent associées aux fragments d'enveloppe nucléaire [Nigg, 1992]. De plus, lorsque transfectées dans des cellules P19, les lamines C, qui n'ont pas de boîte CaaX, n'intégraient la lamina nucléaire que lorsque les cellules avaient effectué une mitose alors que les lamines A, qui possèdent ce motif, pouvaient l'intégrer pendant l'interphase [Horton et al., 1992].

Le rôle de l'isoprénylation dans l'attachement à la membrane nucléaire ainsi que la localisation intracellulaire de cette étape d'isoprénylation demeurent cependant controversés. Firmbach-Kraft et Stick [1993; 1995] ont suggéré que la lamine B₃ de *Xenopus* serait isoprenylée dans le cytoplasme avant l'entrée au noyau. Cette lamine B₃ est particulière car, bien qu'elle soit isoprenylée, elle est soluble au moment de la métaphase méiotique. Ces auteurs ont suggéré que l'isoprénylation ne suffirait pas à associer les lamines aux membranes de façon stable et que d'autres facteurs seraient impliqués dans cette association. Kitten et Nigg [1991], pour leur part, ont observé qu'une mutation de la C⁵⁹⁷→A de la lamine B₂ de poulet conduisait à son accumulation dans le nucléoplasme et ils ont suggéré que les modifications post-traductionnelles de la lamine se produiraient immédiatement après sa synthèse, au niveau des polyribosomes.

En ce qui concerne la lamine A, l'étape d'isoprénylation est essentielle au processus de maturation de la protéine. Si l'isoprénylation est inhibée, la protéine demeure sous forme de précurseur [Beck et al., 1990 ; Hennekes et Nigg, 1994 ; Holtz et al., 1989 ; Sinensky et al., 1994a]. La mévinoline (lovastatine), un inhibiteur de la

synthèse du mévalonate, bloque la biosynthèse des isoprénoïdes farnésyl et géranyl-géranyl pyrophosphates. Par conséquent, le traitement des cellules à la mévinoline permet l'accumulation du précurseur de la lamine A. La demi-vie du précurseur de la lamine A, accumulé lors de ce traitement, est d'environ 100 minutes. Quatre heures après l'ajout de mévalonate, pour contrecarrer le blocage par la mévinoline, toute la lamine A se retrouve sous forme mature [Beck et al., 1990]. Dans les conditions d'inhibition de l'isoprénylation, l'accumulation du précurseur de la lamine A se ferait dans le nucléoplasme sous forme d'agrégats de protéines [Lutz et al., 1992]. Ces résultats ont conduit à la suggestion que l'isoprénylation se ferait dans le noyau et que la coupure du peptide isoprénylé se ferait au niveau de la membrane nucléaire. Dans cette même étude, la surexpression d'une lamine A mature a conduit à son assemblage en lamina, contrairement à ce que d'autres avaient observé. Selon ces auteurs, le peptide carboxy-terminal bloquerait l'assemblage dans la lamina et le rôle de la coupure protéolytique, initiée par l'isoprénylation, serait de permettre l'assemblage de la protéine en lamina. La présence des deux sous-unités de la protéine farnésyl-transferase a été observée dans le cytoplasme et dans le noyau [Sinensky et al., 1994a] permettant ainsi d'appuyer cette hypothèse. La majorité des expériences de transfections dans lesquelles les lamines A étaient non-isoprénylables ont montré une accumulation dans le nucléoplasme, suggérant une incompétence pour intégrer la lamina [Hennekes et Nigg, 1994 ; Holtz et al., 1989 ; Krohne et al., 1989 ; Lutz et al., 1992]. Aucune de ces études n'a cependant permis d'observer le précurseur endogène de la lamine A et de suivre sa maturation ; la possibilité que l'accumulation nucléoplasmique soit une conséquence de la surexpression ne peut donc être exclue. Des travaux récents ont permis de caractériser la protéase qui, coupant la séquence peptidique RSY↓LLG, est impliquée dans cette maturation. L'activité de cette endoprotéase ne serait pas constitutive dans les cellules, mais plutôt régulée par l'expression du précurseur de la lamine A [Kilic et al., 1997a ; 1997b].

3.6 LOCALISATION INTRANUCLÉAIRE DES LAMINES

Les lamines ont généralement été localisées à la périphérie nucléaire [Gerace et al., 1978 ; Gerace et Burke, 1988 ; Nigg, 1992]. Un examen de la lamina en microscopie électronique et en microscopie à fluorescence en trois dimensions a permis de suggérer que la lamina serait discontinue et n'occuperait qu'environ 50 % de la surface de l'enveloppe nucléaire interne [Paddy et al., 1990]. Près de 65 % des loci de chromatine périphérique seraient alignés avec la lamina, mais la distance les séparant serait de près de 0,2 μm ce qui suppose une interaction indirecte entre ces deux éléments. Une analyse ultrastructurale subséquente a cependant démontré que la lamine B serait distribuée de façon continue à l'exception des espaces reliés aux pores nucléaires [Belmont et al., 1993]. De plus, les régions à plus grande concentration en lamines seraient directement juxtaposées aux domaines de chromatine situés à la périphérie nucléaire. Des foyers de lamine B ont aussi été observés en interphase [Moir et al., 1994]. Ces foyers colocalisaient avec des sites de synthèse d'ADN, en particulier à la phase S du cycle cellulaire. Étant donné que les lamines B sont présumées interagir avec les MARs (Régions d'attachement à la matrice) [Luderus et al., 1992 ; Luderus et al., 1994], les auteurs ont suggéré que la lamine B serait impliquée dans l'organisation des usines de réplication.

La microinjection de lamines A biotinylées, dans le cytoplasme de cellules 3T3 de souris, a permis de visualiser le cheminement de ces protéines vers la lamina nucléaire [Goldman et al., 1992]. Ces protéines entraient dans le noyau en 2 à 5 minutes. Elles se situaient alors dans le nucléoplasme, où elles formaient des foyers, avant d'intégrer la lamina. L'intégration était complétée en 5 à 6 heures et les protéines se distribuaient entre les cellules filles à la mitose. Des foyers de lamines ont aussi été observés dans des cellules non-injectées, en particulier dans les phases G1-S du cycle cellulaire. Cette dernière observation supporte l'hypothèse que ces foyers soient des

sites de maturation de la lamine A, ou des sites d'accumulation de lamines en vue de la croissance des noyaux des cellules filles. Une seconde étude vient appuyer ces résultats. Des lamines de type A ont été observées sous forme de foyers nucléoplasmiques par immunofluorescence et microscopie confocale [Bridger et al., 1993]. Dans cette étude, les anticorps étaient incubés longtemps avec les cellules, ce qui pourrait avoir permis une meilleure pénétration dans la chromatine. Ces foyers de lamines de type A formeraient des structures qui seraient présentes pendant la phase G1 du cycle cellulaire et qui disparaîtraient pendant la progression de la phase S. Ces structures n'étaient pas colocalisées avec les membranes nucléaires, mais l'étaient avec les régions de chromatine condensée. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que ces structures seraient dues à la polymérisation des lamines sur l'hétérochromatine, et que cette structure de lamines pourrait diriger l'hétérochromatine à la périphérie lorsqu'elle intègre la lamina. La protéine pRb, produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome, colocaliserait avec les lamines A/C en périphérie nucléaire, ainsi que dans ces structures spécifiques à la phase G1 du cycle cellulaire [Mancini et al., 1994].

La microinjection dans des cellules 3T3 de lamines A de *Xenopus* fluorescentes (marquées au 5-iodoacetamidofluorescein ou 5-IAF), qui menait à leur assemblage en lamina en 60 min, n'a cependant pas permis l'observation de foyers intranucléaires précédant l'assemblage en lamina [Schmidt et al., 1994]. Ces auteurs ont suggéré que la présence de foyers ne serait pas spécifique à la phase G1 du cycle cellulaire et que les noyaux des cellules de souris 3T3 contiendraient des repliements de membranes nucléaires. Les foyers de lamines observés correspondraient selon eux à ces repliements membranaires. Ces auteurs ont aussi remarqué que certains marqueurs fluorescents modifiaient les propriétés d'assemblage des protéines *in vitro*. Ainsi, les protéines marquées au 5-IAF (qui réagit avec les groupes sulfhydryl des cystéines) s'assemblaient comme les protéines de type sauvage, alors que les protéines marquées au FITC (fluorescein Isothocyanate, qui réagit avec des groupes aminés primaires)

semblaient avoir subi des modifications de leur capacité d'assemblage. Par contre, la microinjection d'une lamine A de *Xenopus*-5-IAF ayant une mutation dans la boîte CaaX (C⁶⁶²→S) laissait voir des foyers intranucléaires une heure après la microinjection. Comme cette protéine demeure sous la forme du précurseur, ce résultat est en accord avec l'hypothèse voulant que les foyers soient des sites de maturation de la protéine. Dans une étude subséquente, effectuée sur une période plus longue, ces auteurs ont observé que le mutant *XeLamA*(C⁶⁶²→S)-5-IAF intégrait la lamina, mais moins rapidement que le type sauvage (1 à 2h) vs (30 min à 1h) [Schmidt et Krohne, 1995]. L'intégration du mutant *XeLamA*(Δ598-641), qui correspond à la délétion de résidus impliqués dans une interaction avec la chromatine (voir section 3.7), était encore plus lente (2 à 5h). Le mutant (K²⁸→Q), qui avait les mêmes propriétés *in vitro* que le mutant (Δ598-641), n'intégrait pas la lamina. Finalement, les protéines ayant des délétions des domaines N- ou C-terminal et la mutation (E³⁷⁷→K; E³⁸⁰→K) n'intégraient que peu ou pas la lamina *in vivo*. Les auteurs ont conclu que le motif CaaX et la région qui lie la chromatine *in vitro* contribueraient à promouvoir l'intégration dans la lamina. Ils ont aussi émis l'hypothèse que les phénotypes observés dans les expériences de transfections peuvent être en partie faussés par la surexpression ou la formation de complexes avec les protéines endogènes.

3.7 INTERACTIONS DES LAMINES AVEC D'AUTRES ÉLÉMENTS CELLULAIRES

La lamina nucléaire, étant localisée entre la chromatine et la membrane nucléaire, est présumée interagir avec ces deux composantes nucléaires. La caractérisation des interactions entre les lamines et les autres éléments nucléaires est essentielle à la compréhension du rôle joué par ces protéines nucléaires ubiquitaires.

La morphologie nucléaire permet de supposer que l'enveloppe et la matrice nucléaire puissent servir de point d'ancrage pour la chromatine. L'attachement de la

chromatine à l'enveloppe pourrait se faire via la lamina qui tapisse la membrane nucléaire interne. Des études de «crosslinking» ont montré une association de l'ADN avec les lamines *in vivo* [Galcheva-Gargova et Dessev, 1987]. Depuis, l'association des lamines avec l'ADN a été confirmée par plusieurs études. Des séquences d'attachement à la matrice ont été identifiées et ces MARs se liaient à la lamine B₁ *in vitro* ([Luderus et al., 1992] et les références citées). Les lamines A et C se liaient aussi à certaines séquences d'ADN [Hakes et Berezney, 1991 ; Luderus et al., 1994 ; Sevaljevic et Sekularac, 1993]. La liaison des MARs aux polymères de lamines pourrait se faire via des régions d'ADN simple brin ou via le sillon mineur de l'ADN double brin [Luderus et al., 1994]. Il a été récemment observé que les lamines Dm₀ de la drosophile (lamines de type B) se liaient aux MARs via leur domaine en hélice- α [Zhao et al., 1996]. Ces lamines liaient spécifiquement un fragment d'ADN *in vitro* et ce fragment a été localisé, par hybridation *in situ*, au chromocentre contenant l'hétérochromatine centromérique, ainsi qu'à un locus CD 49 sur le bras droit du chromosome 2 [Baricheva et al., 1996]. Il y aurait environ 120 copies de séquences homologues à ce fragment par noyau haploïde. Les chromocentres ont été colocalisés avec la membrane nucléaire par immunofluorescence. Récemment, des expériences de «photo-crosslinking» ont démontré que les lamines DM₀ se lient à l'ADN et à l'ARN pendant l'interphase mais pas pendant la mitose [Rzepecki et al., 1998].

L'attachement des lamines de type B et de la lamine A à la membrane nucléaire est-il direct ou indirect? L'isoprénylation de ces protéines a été, à maintes reprises, suggérée comme responsable de ce ciblage à la membrane [Hennekes et Nigg, 1994 ; Holtz et al., 1989 ; Horton et al., 1992 ; Kitten et Nigg, 1991 ; Krohne et al., 1989 ; Lutz et al., 1992 ; Nigg et al., 1992]. Cependant, il a été démontré que l'isoprénylation n'est ni essentielle [Schmidt et Krohne, 1995] ni suffisante à ce processus [Firmbach-Kraft et Stick, 1993] (voir section 3.5).

Plusieurs protéines membranaires liant les lamines ont été identifiées. Une protéine membranaire de 58 kDa (p58) a été identifiée chez le poulet. Cette protéine, nommée récepteur de la lamine B (LBR), liait la lamine B *in vitro* [Bailer et al., 1991 ; Worman et al., 1990 ; Worman et al., 1988] et se retrouvait chez une grande variété d'espèces incluant les levures [Shimanuki et al., 1992 ; Smith et Blobel, 1994]. Pendant la mitose, la lamine B et le LBR se retrouvaient associés aux fragments d'enveloppe nucléaire [Meier et Georgatos, 1994 ; Smith et Blobel, 1994]. Le LBR est phosphorylé *in vivo* et cette phosphorylation influence sa liaison avec la lamine B [Appelbaum et al., 1990]. De plus, le LBR se liait aux chromosomes, à la chromatine [Collas et al., 1996 ; Pyrpassopoulou et al., 1996] et à la protéine humaine reliée aux chromodomaines (HP-1) [Ye et al., 1997 ; Ye et Worman, 1996]. La liaison du LBR à la chromatine suggère qu'il pourrait participer au réassemblage de l'enveloppe nucléaire.

D'autres protéines intégrales de la membrane nucléaire interne ont été caractérisées, dont les protéines LAP (lamina associated polypeptide) qui interagiraient avec les lamines et la chromatine [Foisner et Gerace, 1993 ; Furukawa et al., 1995 ; Senior et Gerace, 1988]. Il a été démontré que l'expression des isotypes des protéines LAP1C était régulée au cours de la différenciation des cellules P19 [Martin et al., 1995]. Les protéines LAP1 se liaient aux lamines A, B₁ et C alors que LAP2 se liait seulement à la lamine B₁. Cette liaison de LAP2 à la lamine B₁ serait probablement contrôlée par un mécanisme de phosphorylation. De plus, LAP2 serait capable de se lier à la surface des chromosomes mitotiques. LAP1 et LAP 2 se réassembleraient à la surface des chromosomes en même temps que les lamines à la fin de la mitose [Yang et al., 1997a].

L'association des lamines à la chromatine a été mise en évidence par plusieurs groupes. Burke et Gerace [1986] ont mis au point un système qui permet de reproduire *in vitro* le réassemblage de l'enveloppe nucléaire et ainsi, d'en étudier les événements. Ce système utilise un homogénat de cellules CHO synchronisées en métaphase. Ils ont ainsi observé que les lamines s'assemblaient autour des chromosomes en métaphase et

qu'elles étaient déphosphorylées pendant le processus. De plus, la déplétion immunologique des lamines ainsi que l'utilisation d'ATP γ -S inhibaient le réassemblage de l'enveloppe nucléaire. L'assemblage d'une double membrane à la surface des chromosomes purifiés a pu être obtenue à partir du mélange de différentes fractions de l'homogénat [Burke, 1990]. L'association des lamines aux chromosomes se faisait de façon concomitante à leur décondensation. Lorsque la fraction de cytosol mitotique a été déplétée des membranes, son contenu en lamines a été modifié, la lamine B étant presque totalement associée avec les membranes. Cette fraction déplétée a permis d'observer que les lamines A et C s'assemblaient à la surface des chromosomes et que leur solubilité diminuait progressivement pendant cet assemblage. Finalement, la lamine A s'assemblerait plus rapidement à la surface des chromosomes que la lamine C. Les lamines A et C purifiées à partir de foie de rat ont démontré un comportement similaire [Glass et Gerace, 1990]. La solubilité des lamines en présence de chromosomes était 8 fois plus faible qu'en leur absence. Une digestion tryptique partielle, ou un bref traitement avec une nucléase micrococcalle, de façon à modifier la structure des chromosomes tout en conservant intacts la majorité de leurs constituants, inhibaient l'assemblage des lamines à leur surface. Cette observation a suggéré la présence de sites de liaison sur les chromosomes, sites qui seraient saturables. Ces sites de liaison pourraient être situés de façon à orienter l'association de l'hétérochromatine avec la périphérie nucléaire pendant l'interphase. L'utilisation de lamines A et C humaines recombinantes, produites chez *E. coli*, a permis à Glass et al. [1993] d'identifier un site de liaison aux chromosomes purifiés de cellules CHO. Ce site serait situé dans le domaine en hélice- α , entre les a.a. 31 et 431. Lorsque les essais de liaison se faisaient à un pH entre 5 et 6, la région 31-390 était suffisante pour l'interaction. Des protéines de fusion avec la glutathione-S-transférase (GST) ont aussi été utilisées dans un essai de liaison en phase solide [Taniura et al., 1995]. La liaison des protéines de fusion à des fragments de chromatine, isolée de noyaux de foie de rat,

ou à des histones immobilisés dans des micropuits, ont permis de localiser un site de liaison commun aux lamines A/C, B₁ et B₂. Ce site d'environ 30 a.a. est situé au début du domaine C-terminal des protéines et inclue le SLN. Cette interaction se ferait avec les histones du centre nucléosomique plutôt qu'avec l'histone H1.

Des essais de liaisons de lamines A et B purifiées à partir d'érythrocytes de dinde sur des polynucléosomes purifiés des même cellules ont conduit à l'observation que la lamine A et non la lamine B se liait de façon spécifique aux polynucléosomes. La digestion des polynucléosomes à la trypsine inhibait aussi la liaison, ce qui a conduit à la suggestion qu'une composante protéique serait impliquée [Yuan et al., 1991]. Un essai de liaison, utilisant des lamines solubles traduites *in vitro* et des minichromosomes assemblés dans des extraits nucléaires d'oocytes de *Xenopus*, a permis d'observer la liaison des lamines A et B₂(L_{II}), mais non celles de la lamine B₁(L_I) ou de la lamine C à ces minichromosomes [Hoger et al., 1991]. Cet essai a aussi conduit à l'identification d'une séquence dans le domaine C-terminal de la lamine A qui serait spécifiquement impliquée dans cette interaction. Ce domaine, riche en sérine/thréonine/glycine (a.a. 598-641), se situe dans la portion de la lamine A qui est absente de la lamine C. Le domaine C-terminal de la lamine B₂ contient aussi une région riche en sérine/thréonine/glycine. Le peptide synthétique correspondant à cette région compétitionnait la liaison de la lamine A et de la lamine B avec les minichromosomes. La microinjection de lamine A ayant une délétion de cette région retarderait l'intégration de cette lamine déléetée dans la lamina. (voir section 3.6).

L'association des lamines avec la chromatine a aussi été observée *in vivo*. Une association progressive des lamines de type A de la métaphase à la télophase a été observée par immunofluorescence indirecte dans les cellules de *Xenopus* [Hoger et al., 1991]. Dans ce modèle, la lamine B₂(L_{II}) ne s'associait aux chromosomes qu'à la télophase. La microinjection d'anticorps anti-lamines A-B-C a permis de bloquer les chromosomes en configuration télophase [Benavente et Krohne, 1986]. Dans ces

expériences, l'enveloppe nucléaire se réassemblait de façon irrégulière et les nucléoles ne pouvaient se réorganiser. Des travaux d'immunofluorescence ont aussi permis de détecter une différence d'accessibilité du domaine C-terminal de la lamine A dans des cellules en interphase ou en mitose [Collard et al., 1990], ainsi qu'un changement transitoire de l'accessibilité de ce domaine, induit par un phorbol ester [Collard et Raymond, 1992].

D'autres protéines semblent interagir avec les lamines au cours du cycle cellulaire. La protéine Rb est associée à la matrice nucléaire pendant la phase G1 du cycle cellulaire [Mancini et al., 1994]. Le criblage d'une librairie d'ADNc a permis d'identifier les lamines A/C comme l'un des ligands de Rb [Shan et al., 1992]. La liaison lamine A/C-Rb a été confirmée dans un essai de liaison *in vitro* et il a été observé *in vivo* que Rb colocalise avec les lamines A/C [Mancini et al., 1994]. Le site de liaison se situe entre les résidus 247 à 355 de la lamine A et les résidus 612 à 928 de Rb [Ozaki et al., 1994]. Le rôle présumé de Rb est de lier et d'inactiver des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. La forte expression de lamines A/C dans les cellules non-prolifératives [Coates et al., 1996 ; Pugh et al., 1997] pourrait assister Rb dans sa fonction. Par exemple, tel que suggéré par Coates et al. [1996], Rb pourrait retenir les régulateurs positifs du cycle cellulaire en les emprisonnant dans la lamina.

La protéine E1B 19K d'adénovirus, qui est un homologue de Bcl-2, se lierait aussi aux lamines A/C (résidus 252 à 390). Cette association entre les deux protéines aurait pour rôle de localiser correctement E1B 19K au noyau, afin qu'il exerce sa fonction anti-apoptotique [Rao et al., 1997].

3.8 FONCTIONS ET DYNAMIQUE DES LAMINES AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE

Au cours des dernières années, plusieurs groupes ont tenté de clarifier le rôle des lamines. Leur expression différentielle suggère un rôle dans l'organisation de la structure nucléaire. L'exemple suivant illustre bien cette hypothèse. L'expression forcée de la lamine B₃, qui est spécifique aux cellules germinales, dans des cellules somatiques COP5, a induit une transformation de la morphologie cellulaire. Les cellules exprimant la lamine B₃ sont devenues recourbées avec la forme d'un crochet plutôt que d'avoir la forme arrondie habituelle pour ce type de cellules [Furukawa et Hotta, 1993]. À partir de ces résultats, les auteurs ont suggéré que la lamine B₃ pourrait faire partie des complexes synaptonémaux durant la méiose. Ces complexes sont présents dans les chromosomes pachytènes au niveau des axes associés à la membranes nucléaires. Ainsi la lamine B₃ pourrait jouer un rôle dans la réorganisation des structures nucléaires et chromosomales durant la division méiotique.

Les différences observées dans le comportement des lamines de type A selon l'état de quiescence des cellules est intéressant. Que ce soit par une différence au niveau de la disponibilité de certains de leurs épitopes [Dyer et al., 1997] ou par la diminution de leur expression [Pugh et al., 1997], le fait demeure que la structure formée par les lamines de type A est modifiée. Cette modification pourrait avoir pour effet le réarrangement de la chromatine afin de permettre l'entrée dans le cycle cellulaire et la réplication. La localisation aberrante et/ou l'expression perturbée des lamines de type A dans les cellules cancéreuses viennent appuyer cette hypothèse. En effet, la conséquence de ces perturbations de la structure formée par les lamines de type A pourrait être reliée à la perte de contrôle prolifératif des cellules cancéreuses.

L'organisation tridimensionnelle de la chromatine est un processus dynamique qui recommence à chaque cycle cellulaire. Cette structure doit cependant avoir assez de flexibilité pour permettre la transcription des gènes et la réplication de l'ADN. Afin

d'étudier *in vitro* le réassemblage de l'enveloppe nucléaire, plusieurs systèmes ont été construits à partir d'extraits cellulaires. Certains de ces systèmes, à partir d'extraits de cellules de mammifères [Burke et Gerace, 1986 ; Maison et al., 1995] ou de cellules d'embryon de drosophile [Ulitzur et al., 1992], ont conduit à la conclusion que les lamines étaient nécessaires au réassemblage de l'enveloppe nucléaire. Kouklis et al. [1993] ont observé par la microinjection d'Ac anti-vimentine dans des cellules en mitose, que la perturbation de la vimentine cytoplasmique affectait le réassemblage des lamines à la surface des chromosomes. Les vésicules de membranes nucléaires contenant la lamine B s'associeraient à la vimentine pendant la prométaphase, puis s'en dissocieraient pour aller se lier aux chromosomes pendant les phases subséquentes de la mitose [Maison et al., 1995]. Lorsque la lamine B était extraite de ces vésicules membranaires, leur association avec les chromosomes était abolie. La reconstitution des vésicules par l'ajout de lamine B a restauré leur capacité à lier les chromosomes. Ces résultats, cumulés à l'association *in vitro* du LBR aux chromosomes, suggèrent que plusieurs mécanismes agiraient de concert dans le réassemblage de l'enveloppe nucléaire [Pyrpasopoulou et al., 1996].

Les oocytes de *Xenopus* se sont avérés un des systèmes les plus efficaces pour le réassemblage de l'enveloppe nucléaire autour des chromosomes [Gant et Wilson, 1997]. La déplétion de lamine B₃(L_{III}) d'un extrait d'oeuf de *Xenopus* a d'abord conduit à la conclusion que l'enveloppe nucléaire pouvait se réassembler indépendamment des lamines [Newport et al., 1990]. Cependant, ces enveloppes nucléaires étaient fragiles et leur croissance limitée. Ces noyaux reconstitués étaient incapables de répliquer l'ADN. Des études subséquentes sont arrivées à des observations similaires et ont aussi permis d'observer que des protéines impliquées dans la réplication, comme le PCNA (proliferating cell nuclear antigen), avaient pu pénétrer dans le noyau mais avaient été incapables de s'organiser en centres de réplication [Jenkins et al., 1993 ; Meier et al., 1991]. Ces noyaux reconstitués

permettaient la formation d'une matrice nucléaire et contenaient, malgré l'immunodéplétion, une certaine quantité de lamine B₃. La détection d'une lamine B₂(L_{II}), associée à des vésicules membranaires [Lourim et Krohne, 1993], puis d'une lamine B₁(L_I) [Lourim et al., 1996], a remis en question l'interprétation des résultats précédents. Lourim et al. [1996] ont suggéré que les 3 types de vésicules membranaires associés à des lamines seraient impliqués dans le réassemblage de l'enveloppe nucléaire, dans les extraits d'oeuf. Les travaux subséquents, effectués à partir d'extraits d'oeuf de *Xenopus*, ont dû tenir compte de la présence des différentes lamines. La déplétion de lamine B₃(L_{III}) permettrait le réassemblage de l'enveloppe nucléaire [Goldberg et al., 1995]. Cependant, dans ces expériences, les noyaux étaient plus petits que ceux des contrôles, la présence anormale de paniers de pores nucléaires a été observée à la membrane nucléaire externe et la lamine B₂ était présente dans les extraits. Golberg et al. [1995] ont remarqué que des protéines de la matrice nucléaire avaient aussi été déplétées par coprécipitation avec la B₃. Afin de vérifier si l'incapacité de réplication était bien reliée à la déplétion de lamine B₃, de la lamine B₃ purifiée a été ajoutée à l'extrait déplété. Dans ces conditions, il y a eu formation d'une lamina et formation de centres de réplication fonctionnels. Les auteurs ont conclu que l'assemblage de la lamina était essentiel à la réplication et qu'une lamina bien structurée devait interagir avec des sous-structures nucléaires. L'analyse par FEISEM (field emission in lens scanning electron microscopy) de la matrice nucléaire de ces noyaux assemblés *in vitro* a permis d'observer des filaments dans tout le noyau. Les filaments localisés en surface étaient reliés aux pores nucléaires et contenaient de la lamine B₃ [Zhang et al., 1996a]. Les filaments qui se rendaient à l'intérieur du noyau n'étaient que peu ou pas marqués avec l'anticorps anti-lamine B₃. Dans les noyaux assemblés à l'aide d'extraits déplétés en lamine B₃, les filaments étaient présents, mais faiblement organisés. Les auteurs ont suggéré que la lamine B₃ serait nécessaire à l'organisation de cette matrice interne mais qu'elle n'en ferait pas partie.

Spann et al. [1997] ont microinjecté une lamine A humaine, déléetée de son domaine N-terminal (Δ NLA_n), dans des cellules BHK-21. Cette protéine ne peut pas former de polymères par association en tête à queue. La présence de la Δ NLA_n a conduit à une dissolution de la lamina, et à la formation d'agrégats de lamine A/C et B dans le noyau. Ils ont alors voulu transposer cette expérience dans les noyaux assemblés *in vitro*, avec des extraits d'oeufs de *Xenopus*, qui ne contiennent pas de lamine A. Dans ces noyaux assemblés *in vitro*, la lamine A de type sauvage a été colocalisée avec la lamine B₃ et ces noyaux avaient la capacité de répliquer l'ADN. La Δ NLA_n a dissocié la lamina de ces noyaux et a inhibé la synthèse d'ADN. Cette inhibition se ferait en altérant la distribution des facteurs requis pour la phase d'élongation de l'ADN, tels PCNA et RFC (replication factor C), mais pas des facteurs nécessaires à la phase d'initiation, tel XMCM3 ou la DNA polymérase α . Des travaux similaires, de Ellis et al. [1997], sont arrivés à des résultats légèrement différents. Ils ont utilisé des mutants dominants négatifs, qui consistent en des protéines de fusion de la lamine B₁ avec la GST. Ces mutants consistaient en protéines ayant une délétion du domaine N-terminal (Δ N) plus une délétion de certains a.a. du domaine C-terminal (Δ x-x). Elles ont été nommées Δ 2+ pour le mutant GST- Δ NLB₁ Δ (420-583) (+ car possède le SLN) et Δ 2- pour le mutant GST- Δ NLB₁ Δ (411-583). Les protéines mutantes, ajoutées aux extraits d'oeuf, ont conduit à la formation de noyaux plus petits et, dans le cas de la Δ 2+, les noyaux étaient incapables d'effectuer la répllication de l'ADN. Ainsi, ils confirmaient que la formation de la lamina est essentielle à la formation des sites de répllication. Cependant, lorsque les mutants sont injectés après la formation de la lamina, la Δ 2+ désassemblait la lamina mais la répllication de l'ADN pouvait continuer. Ils ont conclu que la lamina serait nécessaire pour la formation des sites de répllication, mais pas pour le maintien de leur activité. Ils ont suggéré que les résultats obtenus par Spann et al. [1997] seraient dus à l'utilisation d'une lamine de type A. Il est possible que le rôle des lamines de

type A soit différent de celui des lamines de type B dans la formation et/ou le maintien des sites de réplication de l'ADN.

L'importance des lamines a récemment pu être démontrée, chez la drosophile, par l'insertion d'un élément P dans le premier intron du gène de Dm_0 [Lenzbohme et al., 1997]. Les mouches affectées de cette mutation étaient stériles, manquaient de vitalité, avaient des retards de développement et des problèmes de locomotion. Ce phénotype sévère a pu être renversé par la transformation des cellules germinales avec un gène Dm_0 intact. Au niveau ultrastructural, les auteurs ont observé une enveloppe nucléaire incomplète, des amoncellements anormaux de pores nucléaires ainsi qu'une augmentation des lamelles annelées.

Les résultats énumérés précédemment suggèrent que la capacité des extraits à reformer une enveloppe nucléaire ne serait pas suffisante à la formation d'un noyau fonctionnel. L'ensemble des éléments structuraux doivent être assemblés de façon coordonnée. La croissance nucléaire est nécessaire pour le passage en phase S du cycle cellulaire. La microinjection du fragment de la protéine LAP2 responsable de la liaison avec la lamine B a permis l'inhibition de l'augmentation du volume nucléaire et l'inhibition de l'entrée en phase S [Yang et al., 1997b]. Cette protéine serait impliquée dans la croissance de la lamina et cette croissance pourrait être nécessaire afin de permettre le processus de réplication de l'ADN.

Plusieurs modèles ont été suggérés afin d'élucider la dynamique de la lamina et de l'enveloppe nucléaire au cours de la mitose. La figure 8 représente un modèle illustrant les différents événements possiblement impliqués dans le réassemblage de l'enveloppe nucléaire.

Les lamines sont aussi des substrats des ICE (interleukin- 1β -converting enzyme) cystéine protéases au cours de l'apoptose. Il semble que cette dégradation soit indépendante du clivage de l'ADN [Lazebnik et al., 1995]. La dégradation des lamines

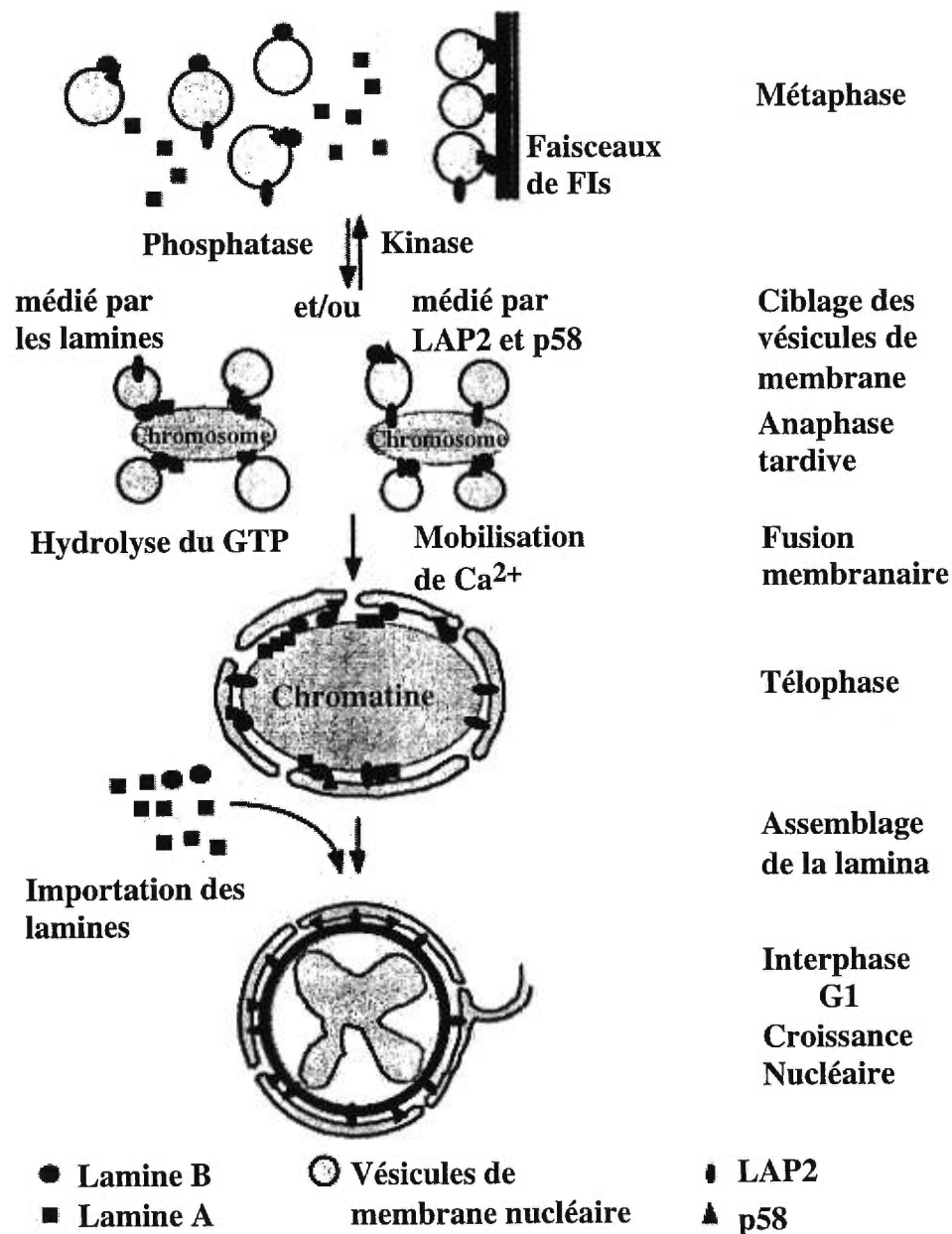


Figure 8 Dynamique des lamines au cours du cycle cellulaire

Assemblage de l'enveloppe nucléaire après la mitose. Le ciblage des fragments d'enveloppe nucléaire vers les chromosomes est médié par l'interaction des chromosomes avec les lamines et/ou avec LAP2 ou p58. La fusion des vésicules membranaires se fait en présence d'une lamina minimale. Ensuite, les autres lamines sont transportées au noyau et assemblées dans la lamina [Foisner, 1997].

précéderait cependant celle de l'ADN [Ankarcrona et al., 1996 ; Neamati et al., 1995 ; Weaver et al., 1996] et pourrait ainsi faciliter les événements apoptotiques. La transfection d'une lamine A contenant la mutation D230→A, dans le consensus du site de clivage de la protéase à cystéine EVD↓, a permis d'observer un retard dans le processus d'apoptose [Rao et al., 1996]. Le bris de la lamina nucléaire pourrait permettre l'empaquetage de la chromatine en corpuscules apoptotiques.

Les lamines seraient aussi impliquées dans la réponse au stress des cellules eucaryotes [Krachmarov et Traub, 1993]. Lorsque les cellules d'ascites de tumeurs de Ehrlich ont été soumises à un choc thermique, la réponse au stress incluait une phosphorylation des lamines et des changements morphologiques de la lamina.

En conclusion, les lamines semblent être des protéines multifonctionnelles. La découverte de protéines interagissant avec les lamines permet de mieux cerner les processus dans lesquels elles sont impliquées. Les lamines forment une structure dynamique complexe qui, par ses interactions, semble coordonner plusieurs événements nucléaires.

4 OBJECTIFS

Les lamines de type A apparaissent au cours du développement et de la différenciation et la lamine A semble avoir plus d'affinité pour la chromatine que la lamine C. La lamine A possède une boîte CaaX, qui représente un signal d'isoprénylation. Cependant, en ce qui concerne la lamine A, cette isoprénylation n'est que transitoire. Ce processus particulier de maturation pourrait avoir un rôle important.

L'objectif principal de mon projet de recherche était d'approfondir nos connaissances sur les particularités de la lamine A. La production d'anticorps spécifiques à la lamine A et à son précurseur nous ont permis d'analyser la localisation intranucléaire de la lamine A *in vivo*. Nos travaux ont permis de montrer que la lamine

A n'est pas localisée uniquement en périphérie nucléaire. Cette protéine se retrouve associée au squelette nucléaire et forme des foyers à l'intérieur du noyau. Nos études ont aussi permis d'observer que l'isoprénylation transitoire de la lamine A n'est pas essentielle à son intégration dans la lamina et que, par conséquent, cette étape de la maturation de la protéine pourrait avoir un autre rôle insoupçonné jusqu'ici. Nous avons ensuite cherché à identifier des éléments impliqués dans l'interaction entre la lamine A et la chromatine afin de faire la lumière sur le rôle fonctionnel de la lamine A. Les lamines étant des protéines insolubles, il est difficile de mettre au point un essai de liaison *in vitro*. Nous avons produit des mutants de délétions correspondant au C-terminal de la lamine A ainsi que des protéines de fusion avec la GST. Les mutants de délétions ont été utilisés dans des essais de liaison sur membrane et ont permis de détecter plusieurs bandes réagissant avec le domaine C-terminal de la lamine A. Les protéines de fusion avec la GST ont permis de sonder des extraits cellulaires en solution. Nous avons ainsi identifié l'actine nucléaire comme protéine interagissant avec la lamine A. L'actine serait l'élément contractile qui, en relation avec les éléments de structure, permettrait le remodelage des domaines nucléaires.

RÉSULTATS

1 LES LAMINES FORMENT UN NUCLÉOSQUELETTE EN PLUS
D'UNE LAMINA PÉRIPHÉRIQUE DANS LES CELLULES
HUMAINES.

LAMIN PROTEINS FORM AN INTERNAL NUCLEOSKELETON AS WELL AS A
PERIPHERAL LAMINA IN HUMAN CELLS.

P. Hozak, **A. M.-J. Sasseville**, Y. Raymond and P.R. Cook.

Journal of Cell Science, 1995 Feb, **108**(2), 635-644.

Les résultats non présentés décrits dans l'article à la page 62, concernant la spécificité
de l'anticorps 133A2, sont illustrés à l'annexe I (page xvi)

Description de la participation de Marie-Josée Sasseville au travail présenté dans l'article suivant:

Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Science*, 1995 Feb, 108(2), 635-644.

La contribution de Marie-Josée Sasseville à cette article est majeure puisqu'elle a effectué la caractérisation complète de l'anticorps monoclonal qui a servi aux études en microscopie optique et électronique effectuées par P. Hozak dans le laboratoire de P. Cook.

Yves Raymond

Yves Raymond, Ph.D.
Directeur de recherche

Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells

Pavel Hozák^{1,2} , A. Marie-Josée Sasseville³, Yves Raymond³ and Peter R. Cook^{1,*}

¹CRC Nuclear Structure and Function Research Group, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RE, UK

²Laboratory of Cell Ultrastructure, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

³Institut du Cancer de Montréal, Centre de Recherche Louis-Charles Simard, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada

*Author for correspondence

SUMMARY

The nuclear lamina forms a protein mesh that underlies the nuclear membrane. In most mammalian cells it contains the intermediate filament proteins, lamins A, B and C. As their name indicates, lamins are generally thought to be confined to the nuclear periphery. We now show that they also form part of a diffuse skeleton that ramifies throughout the interior of the nucleus. Unlike their peripheral counterparts, these internal lamins are buried in dense chromatin and so are inaccessible to antibodies, but accessibility can be increased by removing chromatin. Knobs and nodes on an internal skeleton can then be immunolabelled using fluorescein- or gold-conjugated anti-lamin A antibodies. These results suggest that the lamins are misnamed as they are also found internally.

Key words: cell nucleus, immunoelectron microscopy, lamina, nuclear matrix

INTRODUCTION

The nuclear lamina is a protein mesh underlying the nuclear membrane that remains associated with the residual nuclear envelope after extraction with non-ionic detergents and high concentrations of salt (Newport and Forbes, 1987; Gerace and Burke, 1988). In most mammalian cells, it is composed of the intermediate filament proteins, lamins, A, B and C (Steinert and Roop, 1988). Despite its well-characterized peripheral location, lamins (and/or other intermediate filaments) have occasionally been found internally within nuclei; for example, during G1 or S-phase, in certain pathological states, when mutated, or when overexpressed (e.g. Cardenas et al., 1990; Gill et al., 1990; Bader et al., 1991; Beven et al., 1991; Kitten and Nigg, 1991; Eckelt et al., 1992; Goldman et al., 1992; Lutz et al., 1992; Mirzayan et al., 1992; Bridger et al., 1993; Moir et al., 1994). Moreover, an intermediate-filament-like skeleton is seen in chromatin-depleted nuclei prepared using conditions close to the physiological in cells from all stages of the cycle (Jackson and Cook, 1988; Hozák et al., 1994). Lamins have also been detected within nuclear matrices (Luderus et al., 1992; Minguez and Moreno Diaz de la Espina, 1993; Mancini et al., 1994). But despite these reports, lamins, as their name suggests, are normally considered to be confined to the periphery (e.g. Stick and Hausen, 1980; Gerace et al., 1987; Gerace and Burke, 1988).

We now show that lamins also form part of a diffuse skeleton that ramifies throughout the interior of human nuclei. Visualization of such a skeleton posed several problems. First, chromatin is so dense that it prevents access of the antibodies used for immunolabelling to any underlying skeleton; indeed, the peripheral lamin mesh is closely associated with aligned chromatin fibres (Paddy et al., 1990; Belmont et al., 1993) and internal lamins were only detected in G1 cells after long exposures to antibodies when, presumably, they had time to penetrate into the dense chromatin (Bridger et al., 1993). Second, diffuse skeletons are visualized in the electron microscope with diffi-

culty in the thin sections of <100 nm normally used for immunolabelling. Third, the question of whether an internal nucleoskeleton exists has a long and controversial history; skeletons seen *in vitro* might be artifacts generated by the unphysiological conditions used during isolation (Cook, 1988).

We minimize these problems as follows. Cells are encapsulated in agarose microbeads (diameter 25-150 μm) before cell membranes are permeabilized with Triton X-100 in a 'physiological' buffer; encapsulation protects the fragile cell contents during subsequent manipulations. Access of antibodies to an underlying skeleton is improved by removing most of the chromatin by cutting the chromatin fibre with restriction endonucleases and then removing fragments unattached to the skeleton by electrophoresis in the physiological buffer. As, under optimal conditions, such permeabilized and eluted cells synthesize RNA and DNA at *in vivo* rates (Jackson et al., 1988), it seems unlikely that many nuclear components have been rearranged artifactually. We then use thick resinless sections for electron microscopy (He et al., 1990) to improve detection of diffuse skeletons.

MATERIALS AND METHODS

General procedures

Suspension cultures of HeLa cells were grown, labelled with [*methyl*-³H] thymidine, encapsulated, lysed with 0.2% Triton X-100 (two 5 minute treatments) in ice-cold physiological buffer (PB), washed in PB and ~90% of the chromatin was removed by treatment with *Eco*RI + *Hae*III followed by electrophoresis as described by Hozák et al. (1993). HeLa cells in G2 phase were also collected 20 hours after release of a nitrous oxide block used to accumulate cells in mitosis (Hozák et al., 1993), but cells were unsynchronized unless stated otherwise. Human epithelial HEp-2 cells (ATCC CCL23) were grown in MEM medium in the presence of 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum and 2 mM glutamine.

Antibodies

The monoclonal antibody 133A2 was obtained from the fusion of spleen cells from a mouse immunized with partially purified recombinant human lamin A, expressed from a pUC9 vector (McKeon et al., 1986), with mouse myeloma cells (Raymond and Gagnon, 1988). 133A2 reacted with no proteins other than the various forms of lamin A in whole-cell lysates of 10⁶ HEp-2 cells, as judged by immunoblotting (conditions described below) of two-dimensional gels (not shown).

Primary antibodies (used at 1.0 and 5-10 µg/ml for light and electron microscopy, respectively): anti-lamin A (clone 133A2, a mouse IgG3 kappa monoclonal antibody; see above); anti-lamin A/C (clone 1E4, a mouse monoclonal antibody; Loewinger and McKeon, 1988); anti-lamin A/C (clone L6.8A7; this monoclonal antibody was raised against *Xenopus* lamin III but recognizes human lamins A/C; Stick and Hansen, 1985; Bridger et al., 1993); anti-lamin B₂ (clone LN43, a mouse IgG1; Bridger et al., 1993); anti-hnRNP C1/C2 monoclonal antibody (clone 4F4; Choi and Dreyfuss, 1984);

anti-hnRNP A1 monoclonal antibody (clone 9H10, a gift from Dr G Dreyfuss, which is similar to clone 4B10; Pinol-Roma et al., 1988); anti-vimentin and anti-cytokeratin monoclonal antibodies (Amersham); monoclonal antibody that recognizes most intermediate filaments (TIB-131; Pruss et al., 1981); anti-DNA topoisomerase II (serum BS, a human autoantibody from Dr Earnshaw), anti-coilin (a monoclonal antibody from Dr Carmo-Fonseca), anti-Nopp 140 (Meier and Blobel, 1992).

Secondary antibodies: goat anti-mouse IgG, goat anti-rabbit or goat anti-human IgG, conjugated with FITC (Amersham; 1:400 dilution) or with 5 nm gold particles, (BioCell; human proteins absorbed 1:50 dilution).

Electrophoresis and immunoblotting

SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) or using Tricine (Sigma) as the trailing ion for low molecular mass proteins (Schägger and von Jagow, 1987). Conditions for electrophoretic transfer of proteins on to nitrocellulose sheets and immunodetection were as described (Raymond and Gagnon, 1988) except that peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins were used instead of biotin and avidin conjugates.

Preparation and purification of recombinant lamins

Full-length cDNA for human lamin A (McKeon et al., 1986), a generous gift from Dr F. McKeon (Harvard Medical School), was expressed from a pET vector (Novagen) in BL21(DE3) pLysS bacteria after IPTG induction. Truncated lamin A expression vectors (except for N Δ 463) were constructed using the polymerase chain reaction and subcloning into the TA cloning vector (Invitrogen). All constructs were verified by manual or automated (Pharmacia) DNA sequencing and inserted into the pET vector for expression. Full-length lamin A, carboxyl terminus deletion mutants and the (N Δ 463) mutant

were purified by preparative isoelectric focusing and continuous elution from SDS-PAGE gels (Gagnon et al, 1992). Alternatively, the second purification step was performed on regular slab gels from which lamin bands were excised and lamins recovered by electroelution. Lamin A (NΔ562) was purified by metal chelate affinity chromatography and electroelution from Tricine-SDS-PAGE gels (to be described in detail elsewhere by A.M.-J.S. and Y.R.).

Immunofluorescence

Cells were encapsulated in agarose beads, permeabilized, and then most of the chromatin was removed from half the sample by nuclease treatment followed by electroelution. Cells were then fixed (20 minutes; 4°C) in 4% paraformaldehyde in PB, washed 4× in PB, incubated (1 hour; room temperature) with primary antibody in PBS supplemented with 0.02% Tween-20 (PBT), washed 4× in PBT, incubated (1 hour at room temperature) with secondary antibody, washed 4× in PBT and beads were mounted under coverslips in Vectashield (Vector). Photographs were taken using a Zeiss Axiophot microscope. Alternatively, cells grown on coverslips were washed twice with PBS, fixed for 5 minutes in methanol followed by 10 minutes in acetone, both at -20°C. Indirect immunofluorescence and adsorption experiments using lamins in suspension were performed as described (Collard et al., 1992).

Preembedding immunolabelling and resinless sections

Encapsulated and eluted cells were lightly fixed (10 minutes; 0°C) with 0.1% glutaraldehyde or 1% paraformaldehyde in PB, washed 2× in 0.1 M Na/K phosphate Sørensen buffer (SB; pH 7.4), incubated (10 minutes) in 0.02 M glycine in SB, and rewashed in SB. After incubation (20 minutes; 20°C) with 5% normal goat serum in TBT buffer

(20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 0.005% Tween-20, 20 mM NaN_3 ; pH 8.2), cells were incubated (1 hour; 20°C) with primary antibody in TBT, washed 3× in TBT and incubated (1 hour) with the gold-conjugated secondary antibody (5 nm particles; 50× dilution in TBT + 0.5% fish gelatine; BioCell). After washing 2× in TBT and once in SB, cells were fixed (20 minutes) in 2.5% glutaraldehyde in SB, washed 3× in SB, postfixed with 0.5% OsO_4 in SB, and dehydrated through an ethanol series (including 30 minute incubation in 2% uranyl acetate in 70% ethanol). Ethanol was replaced in three steps by *n*-butanol and samples were then embedded in the removable compound, diethylene glycol distearate (DGD; Polysciences) and resinless sections prepared (Fey et al., 1986; Hozák et al., 1993): beads were immersed in a DGD/*n*-butanol mixture at 60°C, impregnated with pure DGD, blocks hardened, 500 nm thick sections cut using a diamond knife and placed on Pioloform-coated grids (Agar; grids preincubated with poly-L-lysine in water), DGD removed (3× 1.5 hour incubations in *n*-butanol; 20°C), butanol replaced by acetone, and specimens critical-point dried. Sections were observed in a Jeol 100CX electron microscope (accelerating voltage 80 kV). Nuclear morphology was also observed in HeLa sections prepared without immunolabelling after Triton-permeabilization, digestion, electroelution or embedding in DGD.

Postembedding immunoelectron microscopy

Intact unencapsulated HeLa cells in G2 phase were pelleted and fixed (20 minutes; 0°C) in 3% paraformaldehyde in PB. After washing in SB (including 10 minute incubation in 0.02 M glycine in SB), cells were dehydrated in ice-cold ethanol, embedded in LR White (polymerization 24 hours at 50°C) and ultrathin sections on gilded copper grids were immunolabelled. Unspecific binding was blocked by preincubation (30 minutes)

with a 10% normal goat serum in PBS with 0.1% Tween 20 and 1% BSA (PBTB buffer; pH 7.4), sections were incubated (40 minutes) with primary antibodies in PBTB, washed in PBT. incubated (40 minutes) with gold-conjugated secondary antibody in PBTB (pH 8.2), rewashed in PBT and contrasted with a saturated solution of uranyl acetate in water (3 minutes).

Statistical significance was assessed using Student's t-test. Three photographs were taken of the nuclear region and three of the cytoplasmic region of 30 different cells; the number of gold particles per μm^2 was determined and compared with controls in which the primary antibody was omitted.

Testing the stability of the nucleoskeleton

After removal of most of the chromatin from encapsulated HeLa cells by electrophoresis, beads were incubated (20 minutes; 33°C) in PB supplemented with and without DNase I (RNase-free; 6 or 70 U/ml; Boehringer) or RNase (DNase-free, 25 U/ml; Boehringer) in the presence of protease inhibitors (pepstatin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1 mM PMSF; leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

RESULTS

Characterizing monoclonal antibody 133A2

We first characterized a monoclonal antibody (i.e. 133A2) raised against human lamin A. As 133A2 reacted against lamin A but not lamin C, we concluded that it recognized an epitope lying within the 98 amino acid C-terminus that is unique to lamin A, rather than one in the N-terminal 566 amino acids common to both lamins A and C (McKeon et al., 1986; Fisher et al., 1986). Various deletion mutants of lamin A were constructed (Fig. 1A), expressed in bacteria, purified and tested by immunoblotting to see if they were recognized by 133A2. Two-thirds of the N-terminus (Fig. 1 B) could be deleted without affecting reactivity but analysis of C-terminal deletions showed that amino acids 598-611 were essential for reactivity (Fig. 1C).

Removing chromatin improves detection of internal lamins by immunofluorescence

Fig. 2A illustrates a photomicrograph of an encapsulated HeLa cell that has been indirectly immunolabelled using this anti-lamin A antibody. (Unsynchronized populations were used unless stated otherwise.) The peripheral lamina is labelled and there is some weak labelling within nuclei. Removing ~90% chromatin (by nucleolytic treatment and then electrophoresis of detached fragments) has little effect on the peripheral labelling but increases the 'speckly' internal labelling (Fig. 2B); removing chromatin increases accessibility.

An anti-lamin A/C antibody labels the lamina discontinuously and the interior in faint speckles (Fig. 2C); elution again enhances the internal (extra-nucleolar) signal (Fig. 2D). An anti-lamin B₂ antibody predominantly labels the periphery (Fig. 2E) but elution has little effect (Fig. 2F). Elution did not increase any intranuclear signal given by antibodies directed against vimentin, DNA topoisomerase II, coilin, hnRNP proteins

(i.e. C1/C2 and A1) or Nopp 140 (not shown); therefore, the elution-induced enhancement was specific to lamins A/C.

The specificity shown by monoclonal antibody 133A2 for lamin A was confirmed using the truncated lamin A proteins. The fluorescent signal was eliminated by adding proteins containing amino acids 598-611 (Fig. 3B,C) but proteins lacking this region had no effect (Fig. 3D,E). Furthermore, the antibody reacted against no proteins other than the various forms of lamin A on immunoblots of whole cell lysates of HEp-2 cells resolved on a two-dimensional gel (see Materials and Methods).

Internal lamins visualized by immunoelectron microscopy

We next investigated the distribution of lamins by electron microscopy. Fig. 4A illustrates a micrograph of a resinless section (500 nm thick) of a HeLa cell from which ~90% chromatin has been removed. Agarose filaments (a) surround the remnants of the cytoplasm (c). Within the nucleus, residual chromatin is strung along a diffuse nucleoskeleton (ns) that extends from the nucleolus (nu) to the lamina. This diffuse skeleton is associated with the residual ~10% chromatin, dense structures that are the sites of replication and probably sites involved in the transcription and processing of RNA (e.g. Hozák et al., 1993, 1994; Cook, 1994); therefore it is a very complex and ill-defined structure that is best described pictorially. At this stage in the analysis, we use the loose term 'diffuse nucleoskeleton' to describe all of this structure, including its 'core filaments' that we have previously shown have an axial repeat typical of intermediate filaments (Jackson and Cook, 1988; see also He et al., 1990). (In the micrographs presented below, such repeats cannot be seen as the sections have not been shadowed.)

Most intermediate filaments share a common epitope and can be immunolabelled with an antibody directed against it (Pruss et al., 1981; see, however, Reimer et al., 1991), including lamins A,B and C (Lebel and Raymond, 1987); this pan-intermediate-filament antibody does not react with nuclear proteins other than lamins (Belgrader et

al., 1991). Immunogold labelling (Fig. 4B,C) shows that this antibody reacts weakly with the 'core' filaments of the vimentin mesh in the cytoplasm (c), and much more strongly at nodes in this mesh (Fig. 4B). It also labels the lamina (l) and the diffuse nucleoskeleton, again weakly at the core filaments but more strongly at the nodes (Fig. 4B,C). The nucleolus (nu) in Fig. 4C is unlabelled, so labelling does not reflect unspecific labelling of high concentrations of protein or nucleic acid.

The reactivity of the pan-intermediate-filament antibody with internal material cannot result from the (accidental) misincorporation of vimentin destined for the cytoplasm into the nucleoskeleton because anti-vimentin antibodies label the cytoplasm, but not the lamina (l) or the interior of the nucleus (Fig. 4D). Although the intensity of this cytoplasmic labelling is higher than that given by the pan-intermediate-filament antibody, nodes in the cytoplasmic mesh are again more strongly labelled than the core filaments.

We next confirmed that the internal nucleoskeleton contained lamins. The anti-lamin A antibody labelled both the lamina (l) and nodes or knobs on the diffuse skeleton (Fig. 5A); neither the cytoplasm (not shown) nor nucleoli (nu) were labelled (Fig. 5A). The anti-lamin B antibody labelled the lamina (l) in all cells but generally the diffuse nucleoskeleton was unlabelled (Fig. 5B); however, a few nuclei contained labelled foci on the diffuse nucleoskeleton (Fig. 5C). These labelling patterns seen by electron microscopy are similar to those seen by light microscopy in samples from which most chromatin had been removed.

Some internal lamin A might be lost during elution or during the removal of resin from the thick sections when material unattached to the grid surface is lost. Therefore, we examined the distribution of lamin A in uneluted samples using conventional thin (LR White) sections (Fig. 5D). Gold particles are found over the lamina (l) and the nucleoplasm (n), but not the cytoplasm (c). As the diffuse nucleoskeleton is not visible in these thin sections (see Introduction), this labelling pattern is consistent with that

seen in the thick sections. Statistical analysis of 30 HeLa cells in G2 phase like those in Fig. 5D (i.e. in thin sections through the centre of nuclei) confirmed the specificity of this nuclear labelling. The densities of gold particles over the nucleoplasm (including the peripheral lamina) and the cytoplasm and over the nucleoplasm in a control sample in which the first antibody was omitted, were 10.3 ± 4.6 , 0.5 ± 0.8 , and 0.4 ± 0.7 per μm^2 , respectively (3626, 176 and 141 particles were counted over an area of $352 \mu\text{m}^2$ in each case and only nucleoplasmic labelling in the experimental sample was significant; $P < 0.001$). Nuclear labelling was split between the interior and the periphery (generously defined as a zone $0.5 \mu\text{m}$ wide), with 7.1 ± 2.9 and 23.9 ± 5.3 particles per μm^2 over the two regions, respectively. (Both values were significant ($P < 0.01$) compared to the cytoplasmic density or the control in which the first antibody was omitted.) As the internal area in a typical nuclear section is at least three times that of the lamina (defined as above), this means that there was about as much label over the interior as there was over the lamina. Note that cells synchronized in G2 phase were used here, as: (i) it has been suggested that lamins accidentally trapped internally during nuclear reformation might be lost by then (Bridger et al., 1993); and (ii) lamin B is found internally during S-phase at replication sites (Moir et al., 1994).

Characterization of the internal skeleton

We next investigated the nucleic acid content of the nucleoskeleton. As ~10% chromatin remains associated with the diffuse skeleton after treatment with *EcoR1* + *HaeIII* and elution, it remained formally possible that the skeleton consisted of residual chromatin fibres coated with lamins. Therefore, after removing ~90% chromatin as before, beads were treated with DNase and re-eluted to remove most of the remainder (<2% DNA remained). Despite the harsh treatment, the basic internal skeletal structure remained (Fig. 6A).

There have been many suggestions that the skeleton might be associated with RNA (e.g. Long et al., 1979; Fey et al., 1986), so we also treated chromatin-depleted beads with sufficient RNase to remove ~95% of nascent RNA (Jackson and Cook, 1988). This removed the diffuse skeleton and core filaments (Fig. 6B), consistent with RNA being part of the structure. However, nuclear morphology was so distorted that we are loath to draw any firm conclusions from such experiments; the high concentrations of charged oligonucleotides released during digestion might be expected to induce the kind of precipitation of a fragile skeleton on to the stronger lamina that is seen. Nevertheless, we pursued the idea that the diffuse skeleton might contain RNA using antibodies directed against proteins known to be associated with heterogeneous nuclear RNA (i.e. Cl/C2 and A proteins; Choi and Dreyfuss, 1984; Pinol-Roma et al., 1988). Immunogold labelling showed that Cl/C2 were localized on the diffuse skeleton, sometimes concentrated in foci (Fig. 6C). The distribution of A was similar, but the signal was weaker (Fig. 6D).

DISCUSSION

Lamins form part of the internal skeleton

A lamin, or lamina, is defined in the Oxford English Dictionary as 'a thin layer of bone, membrane, or other structure'. Although lamin proteins have been found internally within nuclei (see Introduction), this is generally attributed to a transient, accidental, or pathological, location of proteins destined for a peripheral lamina. Our results show that lamin A is also part of a diffuse internal skeleton that ramifies throughout the nucleus from the nucleolus to the periphery. We have previously shown that 'core filaments' in this complex structure have the axial repeat typical of intermediate filaments (Jackson and Cook, 1988). We use the loose term 'diffuse nucleoskeleton' here to include these core filaments plus all associated knobs, nodes and non-chromatin material. This skeleton is also functionally complex; it contains sites involved in transcription, RNA processing and, in S-phase cells, replication (e.g. Hozák et al., 1993, 1994; Cook, 1994).

We removed most obscuring chromatin from nuclei to leave this diffuse nucleoskeleton; then any lamins associated with it were detected using various antibodies, including one that specifically recognizes an epitope in lamin A between amino acids 598 and 611. Immunofluorescence using this specific antibody, as well as another directed against lamins A/C, revealed internal 'speckles' in HeLa and HEP-2 cells (Figs 2, 4). Electron microscopy using thick (resinless) sections showed that the specific anti-lamin A antibody, and a pan-intermediate-filament antibody, labelled knobs and nodes on the skeleton (Figs 4, 5), whilst an anti-lamin B₂ antibody reacted weakly with foci on the skeleton in a minority of cells (Fig. 5C). None of the antibodies labelled core filaments strongly, but a similar pattern of strong labelling at nodes and weak labelling of intervening core filaments was found when cytoplasmic intermediate filaments were labelled with anti-vimentin. In addition, electron microscopy using

(conventional) thin sections from which no chromatin was removed showed that there was as much lamin A in the interior as at the periphery (Fig. 5D). Therefore, internal lamins could be immunolabelled using different antibodies, techniques and cell types.

Such internal labelling might arise for trivial reasons. For example, the lamina breaks down during mitosis to re-form during anaphase when lamin-containing vesicles coat the segregated mass of chromosomes and fuse into an enclosing membrane (Gerace and Burke, 1988; Dingwall and Laskey, 1992). Vesicles inside the mass could fuse into an internal 'lamina' that would then be no more than a result of the imperfect mechanism for generating an enclosing membrane. We would expect such an internal lamina to redistribute to the periphery with time, but the density of the skeleton and the intensity of immunolabelling remain roughly constant throughout the cell cycle (not shown; Hozák et al., 1994, have studied the morphology of the skeleton throughout the cycle). Stereo electron micrographs also provide no hint that the internal skeleton has been stripped from the periphery during sample preparation (Hozák et al., 1993); moreover, and decisively, internal lamins can be detected in sections derived from G2 cells that have neither been permeabilized nor depleted of chromatin (Fig. 5D).

Relationship to other studies

Our results are consistent with observations of a distribution only at the periphery, if the dense chromatin generally prevents antibody access to the interior. Then the examples of internal lamins cited in the Introduction result not from an aberrant location but from an over-concentration at a normal site.

Lamins are frequently associated with an internal 'matrix' (e.g. Capco et al., 1982; Staufenbiel and Deppert, 1982; Fey et al., 1984) which, like the diffuse nucleoskeleton described here (Fig. 6B-D), contains ribonucleoproteins and, perhaps, RNA (e.g. Long et al., 1979; Fey et al., 1986). It is usually assumed that this matrix cannot contain any lamins, and this may be the reason that attempts to isolate it and

determine its structure have been so unsuccessful (reviewed by Jack and Eggert, 1992); however, this failure is easily explicable if the assumption is incorrect. Intermediate filaments would then play a role in integrating both cytoplasmic and nuclear space (Lazarid-1980). As lamins also bind DNA and/or chromatin (e.g. Shoemann and Traub, 1990; Burke, 1990; Glass and Gerace, 1990; Höger et al., 1991; Yuan et al., 1991; Glass et al., 1993) and have been implicated in replication (e.g. Jenkins et al., 1993; Moir et al., 1994), our results provide a physical basis for additional lamin functions within nuclei (e.g. Traub and Shoeman, 1994).

Our results are consistent with the following model. A branched network of 'core' intermediate filaments ramifies throughout the nucleus. Even in chromatin-depleted samples, much of this network remains covered with polymerases, nascent and maturing RNA, as well as RNPs; in S-phase cells it is also associated with dense replication 'factories'. These elements combine to form a diffuse nucleoskeleton that is probably a 'tensegrity' structure like that popularized by Buckminster Fuller (Ingber, 1993), in and on which nuclear functions occur; then, depolymerization of one element in this structure (e.g. RNA) would collapse the whole. The core filaments of this diffuse nucleoskeleton, like their cytoplasmic counterparts, react weakly with a pan-intermediate-filament antibody and so might contain novel members of the intermediate-filament family; however nodes, 'knobs' and clumps on the nuclear network are clearly labelled by anti-lamin A and, to a lesser extent, by anti-lamin B and so probably mark complex lamin-containing structures. Therefore we must now investigate whether specific protein sequences or post-translational modifications like prenylation (see Kitten and Nigg, 1991; Lutz et al., 1992; Hennekes and Nigg, 1994) determine if a lamin molecule is found at the nuclear periphery, a filament or a node.

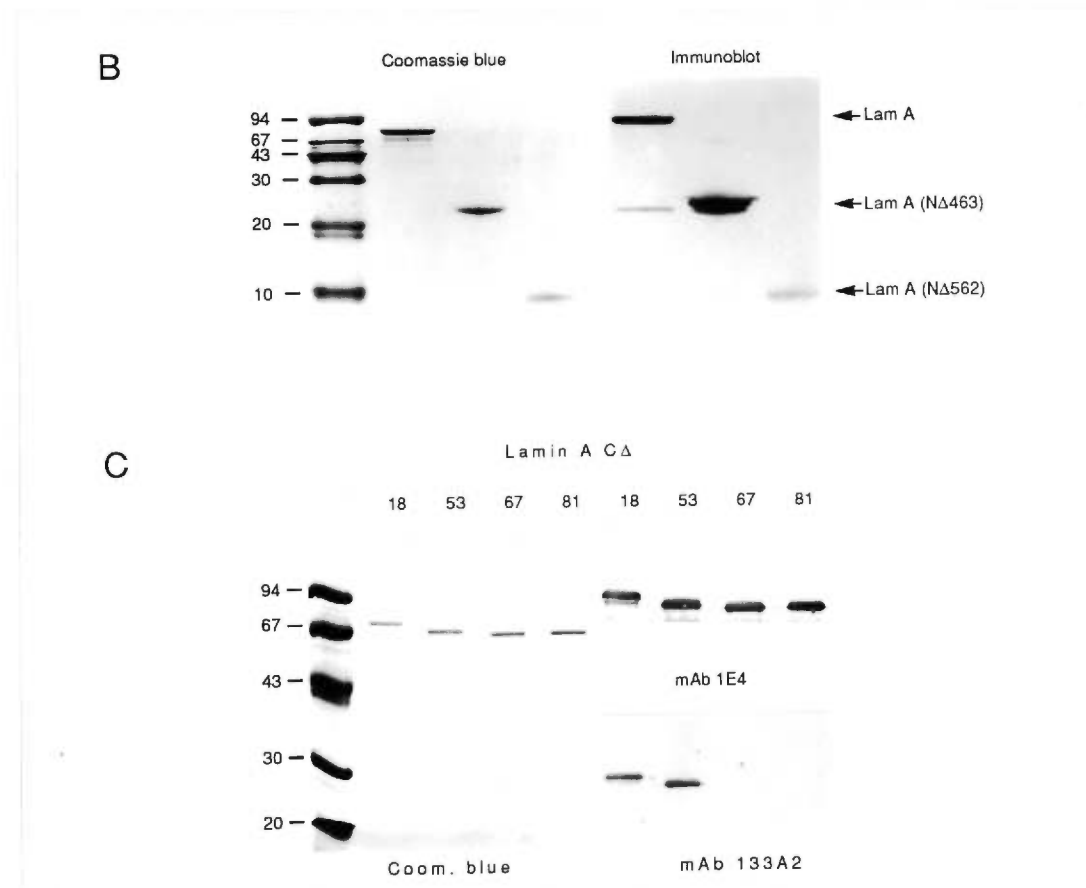
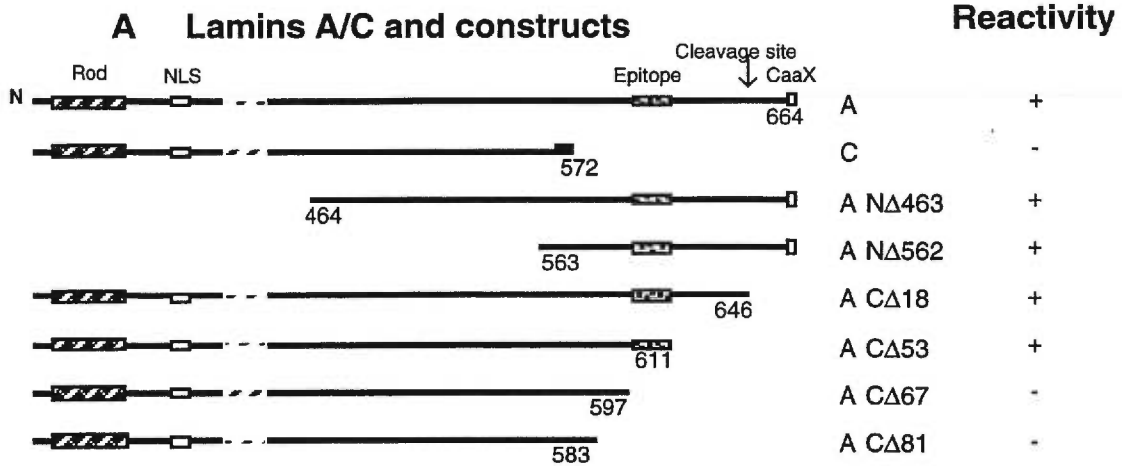


Figure 1 Mapping the epitope recognized by monoclonal antibody 133A2.

(A) Schematic diagrams of lamin A and C (which is identical to lamin A except for 6 amino acids at the C terminus) and of lamin A deletion mutants. The diagrams are not drawn to scale; central regions have been omitted (indicated by hashes) and N termini are shortened to emphasize C termini. Rod domains, nuclear localization signals (NLS), epitopes (residues 598 and 611), proteolytic cleavage sites, CaaX motifs and reactivity with 133A2 are indicated. (B) 133A2 reacts with full-length lamin A and two N-terminal deletion mutants; 2 μ g protein per lane was subjected to Tricine SDS-PAGE and either stained with Coomassie Blue (left) or blotted with 133A2 (right). (C) 133A2 reacts with two of the four C-terminal deletion mutants; 2 μ g protein per lane was subjected to SDS-PAGE and either stained with Coomassie Blue (left) or blotted with 1E4 monoclonal antibody reactive against all mutants (upper right) or 133A2 (lower right). Size (kDa) markers: B and C at left.

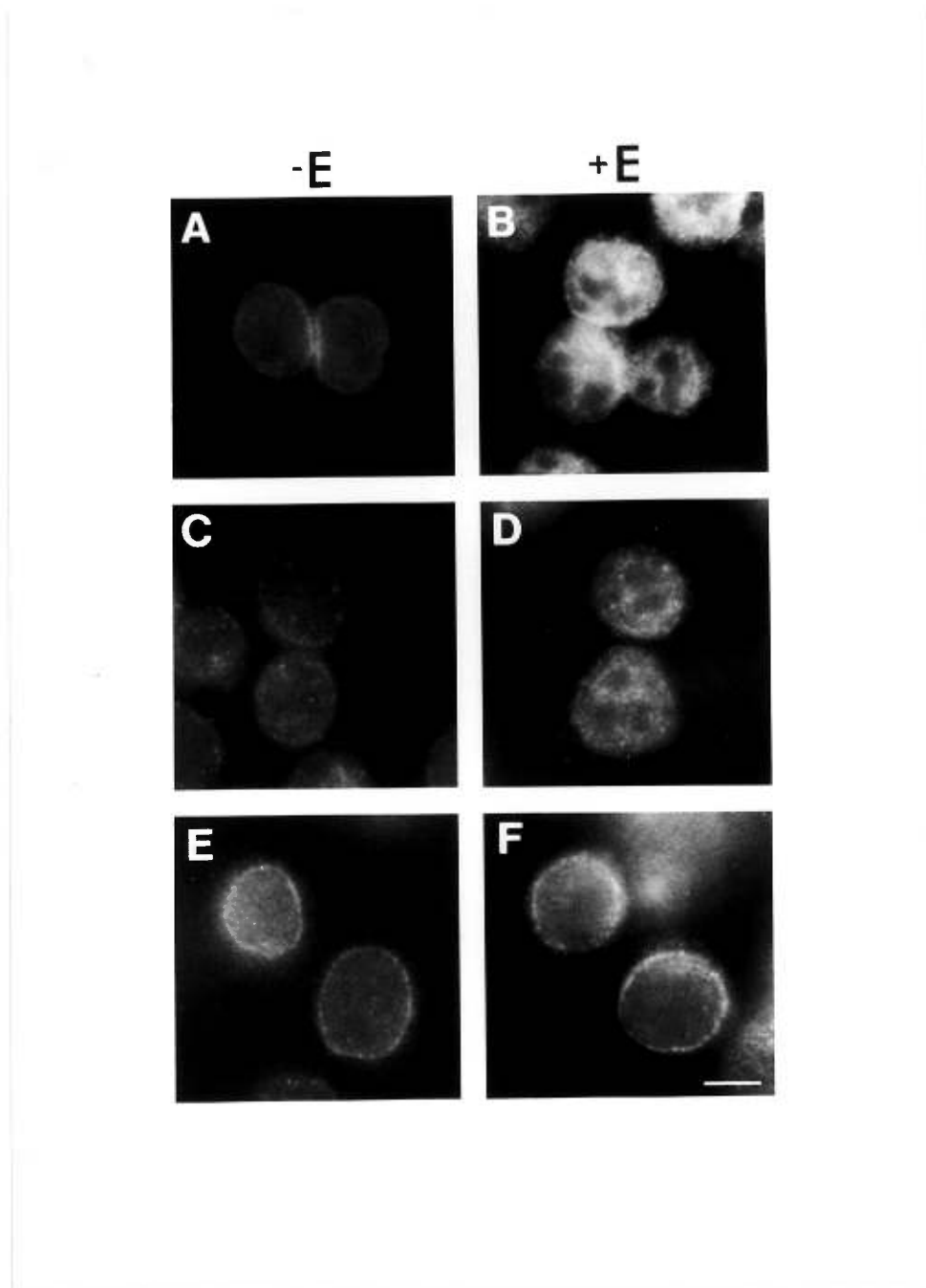


Figure 2 Removing most of the chromatin improves detection of lamin.

(A) Encapsulated HeLa cells were permeabilized and indirectly immunolabelled using antibodies against (A,B) lamin A, (C,D) lamins A/C, and (E,F) lamin B₂ (using 133A2, L6.8A7 and LN43, respectively). -E (A,C,E), untreated; +E (B,D,F), treated with *Eco*R1 + *Hae*III and then subjected to electrophoresis to remove ~90% chromatin. Bar, 5 μ m.

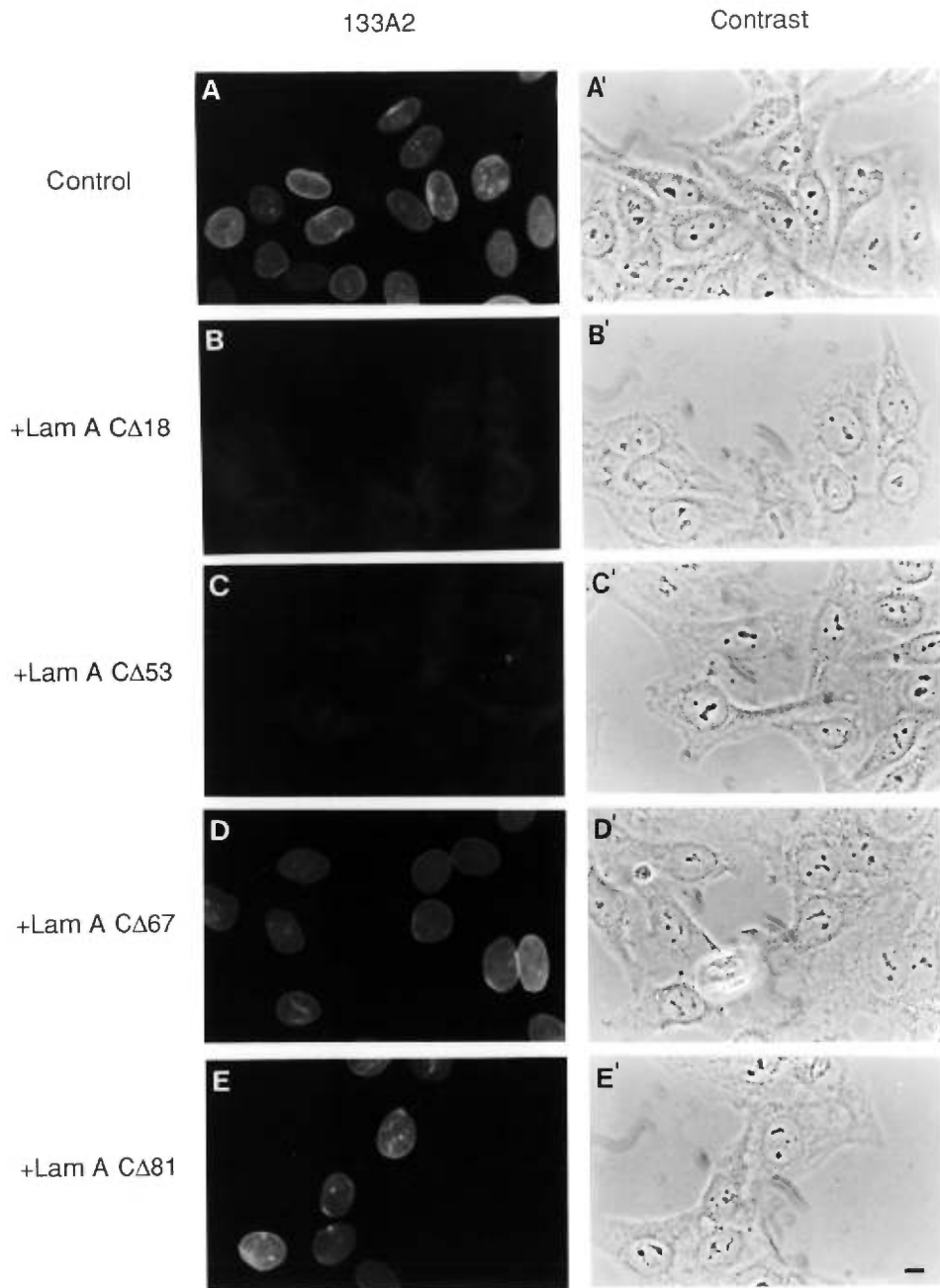


Figure 3 Specificity of monoclonal antibody 133A2.

HEp-2 cells growing on coverslips were permeabilized, indirectly immunolabelled using 133A2 and (right) fluorescence and (left) phase-contrast images of the same field collected. 133A2 was preincubated in the absence of lamin A (A) or in the presence of the purified deletion mutants shown (B-E). Bar, 8 μ m.

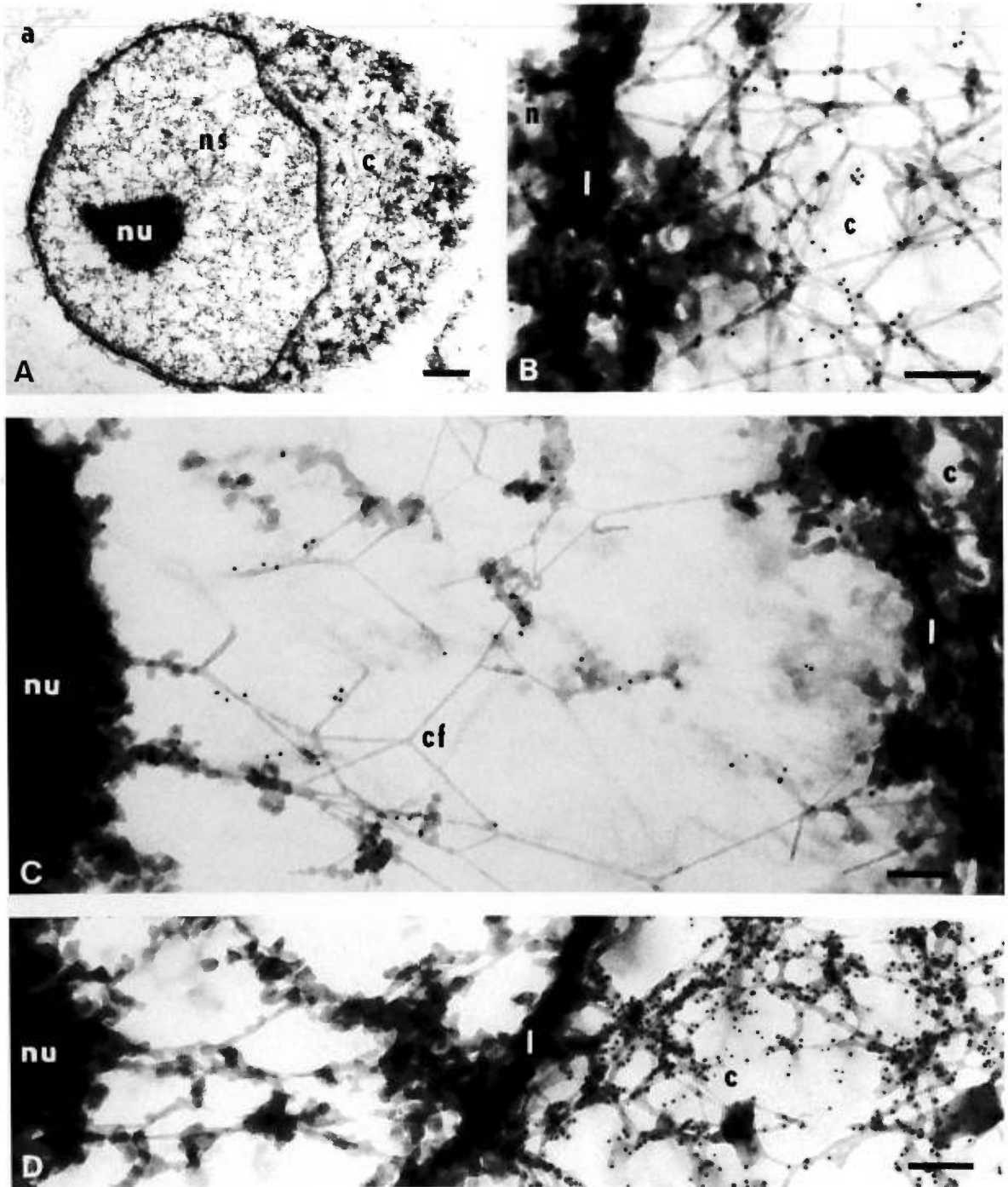


Figure 4 Visualization of an internal nucleoskeleton in HeLa cells from which ~90% chromatin had been removed.

Encapsulated cells were permeabilized, treated with nucleases, chromatin eluted and 500 nm resin-less sections prepared. In B-D, samples were immunolabelled with 5 nm gold particles. a, agarose; c, cytoplasm; nu, nucleolus; ns, nucleoskeleton; n, nucleus; l, lamina; cf, core filaments. Bars: A and B-D, 1 and 0.1 μ m, respectively. (A) Low-power view. (B) Cytoplasmic region; pan-intermediate-filament antibody (i.e. TIB-131). (C) Nuclear region; pan-intermediate-filament antibody; 95% chromatin was removed in this preparation, so more core filaments are visible. (D) Nuclear and cytoplasmic regions; anti-vimentin antibody.

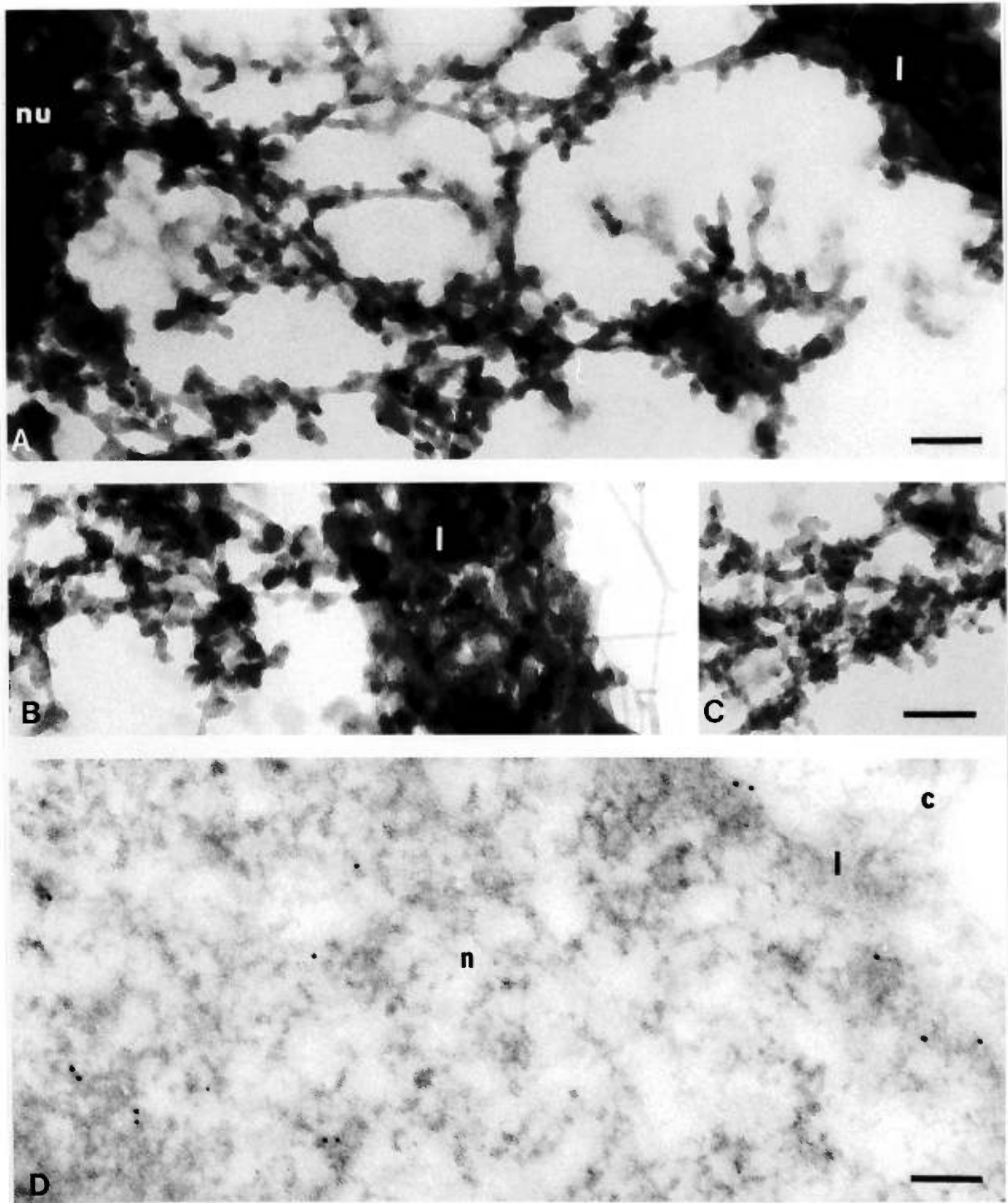


Figure 5 Lamins detected in nuclear regions of HeLa cells by immunogold labelling.

(A-C) resinless sections from which ~90% chromatin has been removed or (D) a conventional thin section prepared without removing any chromatin from cells synchronized in G2 phase. nu, nucleolus; l, lamina; n, nucleus; c, cytoplasm. Bars: 0.1 μ m. (A) Anti-lamin A (clone 133A2); both lamina and internal skeleton are labelled. (B) Anti-lamin B₂ (clone LN43); usually only the lamina is labelled. (C) Anti-lamin B₂ (clone LN43); labelling of internal skeleton seen in 10% sections. (D) Anti-lamin A (clone 133A2); vimentin fibrils in the cytoplasm are unlabelled, but both lamina and internal nuclear regions are labelled.

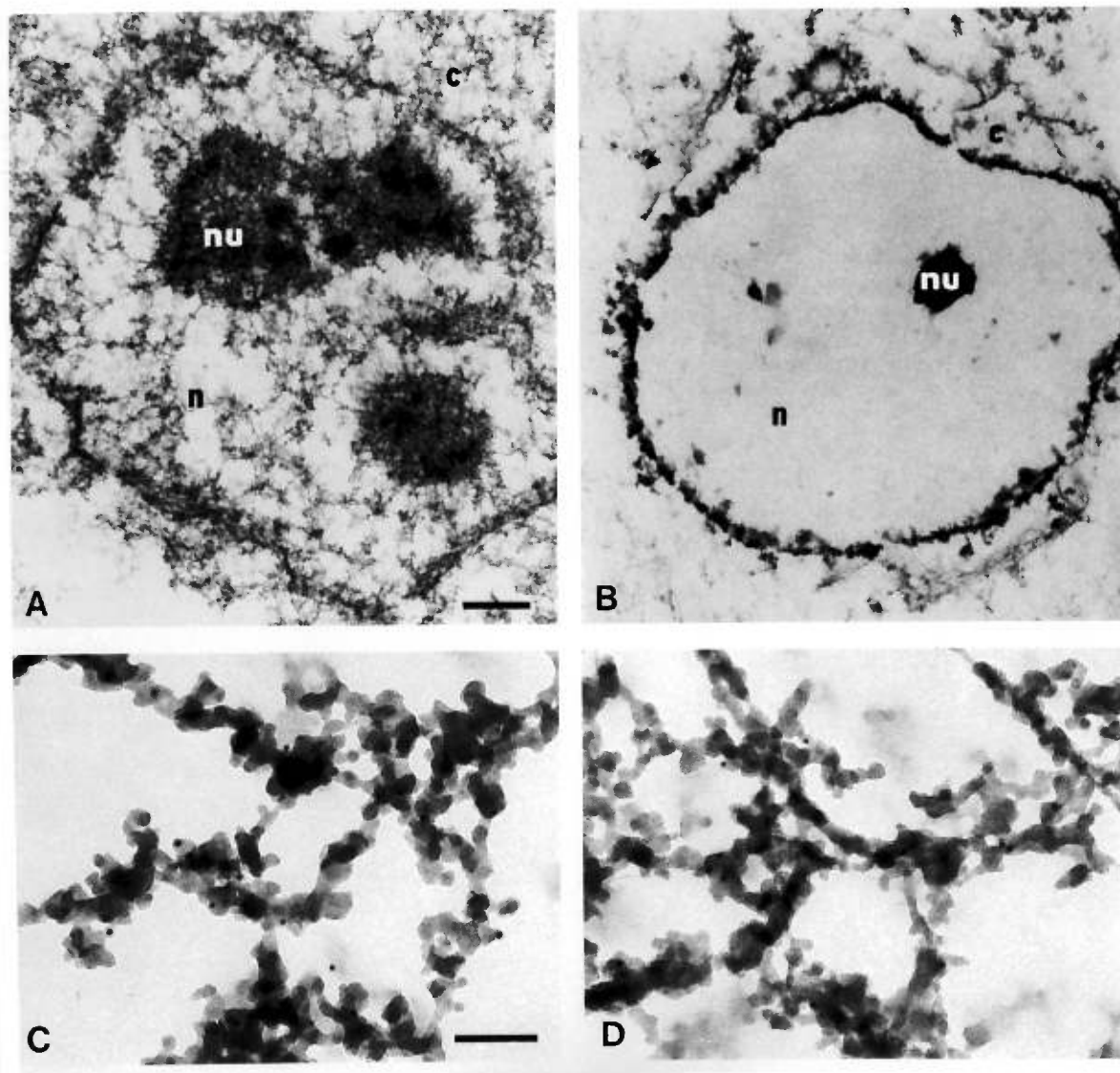


Figure 6 Characterization of the diffuse nucleoskeleton in HeLa cells.

(A,B) The effects of treatment with DNase I or RNase A. Encapsulated cells were permeabilized, treated with *EcoRI* and *HaeIII*, ~90% chromatin eluted, re-treated with (A) DNase or (B) RNase and re-subjected to electrophoresis before resinless sections were prepared. DNase and RNase remove >98% chromatin and >95% nascent RNA, respectively (Jackson and Cook, 1988); DNase does not alter the morphology of the diffuse skeleton but RNase removes it. c, cytoplasm; n, nucleus; nu, nucleolus. Bar, 0.5 μm . (C,D) The nuclear region immunolabelled using antibodies against C1/C2 (C) and A hnRNPs (D) (resinless sections from which ~90% chromatin removed). In both cases the internal nucleoskeleton is labelled. Bar, 0.1 μm .

We thank Drs G. Blobel, M. Carmo-Fonseca, G. Dreyfuss, W. Earnshaw, C. Hutchison, B. Lane, U.T. Meier and R. Stick for kindly supplying antibodies, and Dr. F. McKeon for human lamin cDNA. This work was supported by the Wellcome Trust, the Cancer Research Campaign, the Grant Agency of the Czech Republic (grant no. 304/94/0148), the Academy of Sciences of the Czech Republic (grant no. 539402), and the Medical Research Council of Canada with a studentship (A.M.-J.S.) and an operating grant.

REFERENCES

- Bader, B. L., Magin, T. M., Freudenmann, M., Stumpp, S. and Franke, W. W.** (1991). Intermediate filaments formed *de novo* from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus. *J. Cell Biol.* **115**, 1293-1307.
- Belgrader, P., Siegel, A. J. and Berezney, R.** (1991). A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *J. Cell Sci.* **98**, 281-291.
- Belmont, A. S., Zhai, Y. and Thilenius, A.** (1993). Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J. Cell Biol.* **123**, 1671-1685.
- Beven, A., Guan, Y., Peart, J., Cooper, C. and Shaw, P.** (1991). Monoclonal antibodies to plant nuclear matrix reveal intermediate filament related components within the nucleus. *J. Cell Sci.* **98**, 293-302.
- Bridger, J. M., Kill, I. R., O'Farrell, M. and Hutchison, C. J.** (1993). Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J. Cell Sci.* **104**, 297-306.
- Burke, B.** (1990). On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* **186**, 169-176.
- Capco, D. G., Wan, K. M. and Penman, S.** (1982). The nuclear matrix: three dimensional architecture and protein composition. *Cell* **29**, 847-858.
- Cardenas, M. E., Laroche, T. and Gasser, S. M.** (1990). The composition and morphology of yeast nuclear scaffolds. *J. Cell Sci.* **96**, 439-450.
- Choi, Y. D. and Dreyfuss, G.** (1984). Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* **99**, 1997-2004.
- Collard, J. F., Senécal, J. L. and Raymond, Y.** (1992). Redistribution of nuclear lamin A is an early event associated with differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Cell Sci.* **101**, 657-670.
- Cook, P. R.** (1988). The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site? *J. Cell Sci.* **90**, 1-6.
- Cook, P. R.** (1994). RNA polymerase: structural determinant of the chromatin loop and the chromosome. *BioEssays* **16**, 425-430.
- Dingwall, C. and Laskey, R.** (1992). The nuclear membrane. *Science* **258**, 942-947.

- Eckelt, A., Hermann, H. and Franke, W. W.** (1992). Assembly of a tail-less mutant of the intermediate filament protein, vimentin, *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Cell Biol.* **58**, 319-330.
- Fey, E. G., Wan, K. M. and Penman, S.** (1984). Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three dimensional Organisation and protein composition. *J. Cell Biol.* **98**, 1973-1984.
- Fey, E. G., Krochmalnic, G. and Penman, S.** (1986). The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section microscopy. *J. Cell Biol.* **102**, 1654-1665.
- Fisher, D. Z., Chaudhary, N. and Blobel, G.** (1986). cDNA sequencing of lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 6450-6454.
- Gagnon, G., Sasseville, A. M.-J. and Raymond, Y.** (1992). Preparative 2-D electro phoresis system purifies recombinant nuclear protein from whole bacterial lysates. *Bio-Rad US/EG Bulletin* 1773.
- Gerace, L., Blum, A. and Blobel, G.** (1987). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction: interphase and mitotic distribution. *J. Cell Biol.* **79**, 546-566.
- Gerace, L. and Burke, B.** (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 335-374.
- Gill, S. R., Wong, P. C., Monteiro, M. J. and Cleveland, D. W.** (1990). Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. *J. Cell Biol.* **111**, 2005-2019.
- Glass, C. A., Glass, J. R., Taniura, H., Hasel, K. W., Blevitt, J. M. and Gerace, L.** (1993). The α -helical rod domain of lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO J.* **12**, 4413-4424.
- Glass, J. R. and Gerace, L.** (1990). Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* **111**, 1047-1057.
- Goldman, A. E., Moir, R. D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. and Goldman, R. D.** (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **119**, 725-735.
- He, D., Nickerson, J. A. and Penman, S.** (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* **110**, 569-580.
- Hennekes, H. and Nigg, E. A.** (1994). The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins; a single point mutation prevents proteolytic cleavage of

- the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *J. Cell Sci.* **107**, 1019-1029.
- Höger, T. H., Krohne, G. and Kleinschmidt, J. A.** (1991). Interaction of *Xenopus* lamins A and L11 with chromatin *in vitro* mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp. Cell Res.* **197**, 280-289.
- Hozák, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A. and Cook, P. R.** (1993). Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* **73**, 361-373.
- Hozák, P., Jackson, D. A. and Cook, P. R.** (1994). Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **107**, 2191-2202.
- Ingber, D. E.** (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **104**, 613-627.
- Jack, R. S. and Eggert, H.** (1992). The elusive nuclear matrix. *Eur. J. Biol. Chem.* **209**, 503-509.
- Jackson, D. A. and Cook, P. R.** (1988). Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat. *EMBO J.* **7**, 3667-3677.
- Jackson, D. A., Yuan, J. and Cook, P. R.** (1988). A gentle method for preparing cyto- and nucleo-skeletons and associated chromatin. *J. Cell Sci.* **90**, 365-378.
- Jenkins, H., Holman, T., Lyon, C., Lane, B., Stick, R. and Hutchison, C.** (1993). Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. *J. Cell Sci.* **106**, 275-285.
- Kitten, G. T. and Nigg, E. A.** (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B₂. *J. Cell Biol.* **113**, 13-23.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazarides, E.** (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **283**, 249-246.
- Lebel, S. and Raymond, Y.** (1987). Lamins A, B and C share an epitope with the common domain of intermediate filament proteins. *Exp. Cell Res.* **169**, 560-565.
- Loewinger, L. and McKeon, F.** (1988). Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J.* **7**, 2301-2309.

- Long, B. H., Huang, C.-Y. and Pogo, A. O.** (1979). Isolation and characterization of the nuclear matrix in Friend erythroleukaemia cells: chromatin and hnRNA interactions with the nuclear matrix. *Cell* **18**, 1079-1090.
- Luderus, M. E. E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J. L., Grande, M.A., de Jong, L. and van Driel, R.** (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B₁. *Cell* **70**, 949-959.
- Lutz, R. J., Trujillo, M. A., Denham, K. S., Wenger, L. and Sineusky, M.** (1992). Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 3000-3004.
- Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S. and Lee, W.-H.** (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 418-422.
- McKeon, F. D., Kirshner, M. W. and Caput, D.** (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**, 463-468.
- Meier, U. T. and Blobel, G.** (1992). Noppl40 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* **70**, 127-138.
- Minguez, A. and Moreno Diaz de la Espina, S.** (1993). Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *J. Cell Sci.* **106**, 431-439.
- Mirzayan, C., Copeland, C. S. and Snyder, M.** (1992). The *NUF1* gene encodes an essential coiled-coil related protein that is a potential component of the yeast nucleoskeleton. *J. Cell Biol.* **116**, 1319-1332.
- Moir, R. D., Montag-Lowy, M. and Goldman, R. D.** (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J. Cell Biol.* **125**, 1201-1212.
- Newport, J. W. and Forbes, D. J.** (1987). The nucleus: structure, function and dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 535-565.
- Paddy, M. R., Belmont, A. S., Saumweber, H., Agard, D. A. and Sedat, J.W.** (1990). Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* **62**, 89-106.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y. D., Matunis, M. J. and Dreyfuss, G.** (1988). Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev.* **2**, 215-227.

- Pruss, R. M., Mirsky, R., Raff, M. C., Thorpe, R., Dowding, A. J. and Anderton, B. H.** (1981). All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* **27**, 419-428.
- Raymond, Y. and Gagnon, G.** (1988). Lamin B shares a number of distinct epitopes with lamins A and C and with intermediate filament proteins. *Biochemistry*, **27**, 2590-2597.
- Reimer, D., Dodemont, H. and Weber, K.** (1991). Cloning of the nonneuro-nal intermediate filament protein of the gastropod *Aplysia californica*. *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 351-357.
- Schägger, H. and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Shoemann, R. L. and Traub, P.** (1990). The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *J. Biol. Chem.* **265**, 9055-9061.
- Staufenbiel, M. and Deppert, W.** (1982). Intermediate filament systems are collapsed onto the nuclear surface after isolation of nuclei from tissue culture cells. *Exp. Cell Res.* **138**, 207-124.
- Steinert, P. M. and Roop, D. R.** (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 593-626.
- Stick, R. and Hansen, P.** (1980). Immunological analysis of nuclear lamina proteins. *Chromosoma* **80**, 219-236.
- Stick, R. and Hansen, P.** (1985). Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**, 191-200.
- Traub, P. and Shoeman, R. L.** (1994). Intermediate filament and related proteins: potential activators of nucleosomes during transcription initiation and elongation? *BioEssays* **16**, 349-355.
- Yuan, J., Simos, G., Blobel, G. and Georgatos, S. D.** (1991). Binding of lamin A to polynucleosomes. *J. Biol. Chem.* **266**, 9211-9215.

(Received 20 July 1994 - Accepted 3 October 1994)

2 LE PRÉCURSEUR DE LA LAMINE A EST LOCALISÉ DANS DES
FOYERS INTRANUCLÉAIRES.

LAMIN A PRECURSOR IS LOCALIZED TO INTRANUCLEAR FOCI.

A. M.-J. Sasseville and Y. Raymond.

Journal of Cell Science, 1995 Feb, **108**(1), 273-285.

Lamin A precursor is localized to intranuclear foci

A. Marie-Josée Sasseville and Yves Raymond*

Institut du cancer de Montréal,
Centre de recherche Louis-Charles Simard,
Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec,
Canada H2L 4M1

*Author for correspondence

SUMMARY

Lamin A is synthesized in the cytoplasm as a precursor bearing a carboxyl-terminal CaaX box or isoprenylation signal. This precursor is post-translationally processed through multiple steps: isoprenylation with a farnesyl residue on the cysteine of the CaaX box, proteolytic removal of the last three amino acids, carboxymethylation of the cysteine residue and, finally, proteolytic removal of 15 amino acids from the carboxyl terminus. This last step gives rise to mature lamin A from which the isoprenylated terminus has been removed. Isoprenylation is a prerequisite for all other steps of processing. The subcellular location of these processing steps for lamin A is still a matter of debate. We have produced an antibody specific to the 18 amino acid carboxyl terminus of the lamin A precursor that does not recognize mature lamin A. This antibody detects intranuclear foci by immunofluorescence. Larger amounts of lamin A precursor were accumulated by treating cells with mevinoлин (MVN), an inhibitor of isoprenoid synthesis. In MVN-treated cells, the lamin A precursor accumulated most strikingly in the peripheral nuclear lamina where it was assembled, while intranuclear foci were maintained. The addition of an excess of mevalonate (MVA), which restores isoprenylation activity, to MVN-treated cells led to a progressive disappearance of the lamin A precursor from the peripheral lamina. This process was completed after 4 hours of MVA treatment, after which the lamin A precursor was restricted to intranuclear foci. We conclude from these results that the non-isoprenylated lamin A precursor appears competent for assembly into the peripheral nuclear lamina, and that all

the processing steps leading to mature lamin A can occur within the nuclear space.

Key words: lamin, isoprenylation, precursor

INTRODUCTION

The nuclear lamina is a polymeric meshwork of proteins called lamins that lines the nucleoplasmic face of the inner nuclear membrane of all eukaryotic cells (for review, see Gerace and Burke, 1988; Nigg, 1992; Spector, 1993). Lamins were classified into type A and type B according to their biochemical properties and to their subcellular distribution in mitotic cells (for a review see Nigg, 1992; see also Lourim and Krohne, 1993). In mammalian cells, type A lamins consist of two polypeptides, lamins A and C, that share the first 566 amino acids and differ only by the length of their carboxyl terminus, of 98 and 6 amino acids, respectively (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986). These two polypeptides arise from differentially spliced transcripts of a single gene (Lin and Wonnan, 1993).

Recent studies have shown that lamins are also found in foci within the nucleoplasm, specifically during the G1 phase of the cell cycle (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993; Mancini et al., 1994). This nucleoplasmic localization appears to be transient and has been putatively related to localization of intermediates along the post-translational modification pathway (see below) followed by lamins (for a review, see Moir and Goldman, 1993). Alternatively, intranuclear foci may represent pools of lamins that are available for growth of daughter nuclei (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993). These results illustrate the need for a more detailed study of the localization of lamin intermediates.

Lamin A is unusual amongst nuclear proteins in being synthesized as a precursor (Laliberté et al., 1984; Gerace et al., 1984) that is cleaved proteolytically during the course of its assembly in the lamina (for review see Nigg, 1992; Moir and Goldman, 1993). The half-life of the lamin A precursor is of the order of 90-100 minutes and it is completely chased into the mature form of lamin A within 4 hours (Gerace et al., 1984; Beck et al., 1990). Lamin A bears an isoprenylation signal (for review, see Clarke,

1992; Sinensky and Lutz, 1992) or CaaX box (where C is a cysteine residue, a is an aliphatic residue and X is any amino acid) at its extreme carboxyl terminus (Fisher et al., 1986), a feature that is absent from the sequence of lamin C (see Krohne et al., 1989; Horton et al., 1992). Hence, lamin A is isoprenylated with a farnesyl residue on the cysteine, the last three amino acids are removed and the terminal cysteine is carboxymethylated (Sinensky et al., 1994b, and references therein). These modifications also occur on type B lamins (Farnsworth et al., 1989; Firmback-Kraft and Stick, 1993; Nigg, 1992). However, what distinguishes the processing of lamin A from that of type B lamins is a further proteolytic cleavage of a fragment of 15 amino acids from the carboxyl terminus (Gerace et al., 1984; Weber et al., 1989; Hennekes and Nigg, 1994), thereby removing the isoprenylated end of the lamin A precursor. The physiological role of this cleavage step is not understood but loss of this fragment does not impair the ability of lamin A to be reassembled in daughter nuclei after mitosis. Isoprenylation of lamin A is a prerequisite step for all the other reactions to occur, including cleavage of the 15 amino acid carboxyl-terminal fragment (Holz et al., 1989; Beck et al., 1990; Hennekes and Nigg, 1994; Sinensky et al., 1994b).

The subcellular sites where the lamin A precursor is posttranslationally modified have not been definitely identified. Some authors conclude from kinetic studies that lamin processing occurs in the cytoplasm (Kitten and Nigg, 1991). Some have concluded from biochemical studies that the lamin A precursor is first assembled in the lamina and only subsequently cleaved to the mature form (Gerace et al., 1984; Beck et al., 1990). Others have concluded that cleavage and assembly of the lamin A precursor are concomitant (Lehner et al., 1986). Still others have shown nucleoplasmic accumulation of the lamin A precursor under conditions where its isoprenylation was prevented (Holz et al., 1989; Krohne et al., 1989; Lutz et al., 1992; Hennekes and Nigg, 1994), thus concluding that isoprenylation was required for assembly of the lamin A precursor into the lamina. Moreover, it has been shown that a lamin A mutant lacking 21 amino acids

from its carboxyl terminus, i.e. without any isoprenylation signal, was nevertheless competent for assembly into the lamina (Lutz et al., 1992). The authors of the latter study concluded that the presence of the carboxyl-terminal extension of the lamin A precursor blocked its assembly in the lamina (Lutz et al., 1992). In a different study, a lamin A precursor was used in which the CaaX box had been altered. This non-isoprenylated lamin A precursor was shown to be partially competent for assembly in the lamina (Krohne et al., 1989). Kinetic evidence from microinjection studies with full-length lamin A supports the suggestion of transient passage of lamin A through intranuclear foci prior to its assembly in the lamina (Goldman et al., 1992). However, this last study could not distinguish between localization of lamin A precursor and mature forms. Finally, a recent study has localized both subunits of a farnesyl-protein transferase in the nucleus as well as in the cytoplasm (Sinensky et al., 1994b), which supports the possibility that isoprenylation and subsequent processing of the lamin A precursor occur in the nucleus (see also Beck et al., 1990; Lutz et al., 1992). The major limitations of these studies are: (a) the use of sole biochemical criteria for subcellular localization; (b) the presence of excess lamin A through overexpression or microinjection of heterologous wild-type or mutant molecules; and (c) the inability to distinguish between lamin A precursor and mature forms. No study to date has been performed on the localization of the endogenous lamin A precursor in untreated cells.

In this study, using antibodies that react exclusively against the precursor form of lamin A, we show for the first time that the endogenous lamin A precursor is predominantly localized in intranuclear foci, under normal conditions. When isoprenylation is inhibited, the lamin A precursor is still present in foci but it is mostly accumulated in the lamina where it is assembled. The precursor gradually disappears from the lamina when isoprenylation is resumed but remains present in intranuclear foci. We conclude from these observations that isoprenylation and cleavage of the lamin A precursor can

both occur in the nucleus, and that the non-isoprenylated lamin A precursor appears competent for assembly in the lamina.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human epitheloid carcinoma cells (HEp-2, ATCC CCL 23) were grown in minimal essential medium in the presence of 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES-NAOH, pH 7.2, and antibiotics (penicillin, streptomycin, kanamycin). Synthesis of isoprenoids was blocked by treating cells with 25 μ M mevinolin (MVN), a kind gift from Dr H. Brunengraber, formerly of this Research Center, that had been converted from the lactone form to the sodium salt as described (Habenicht et al., 1980). Inhibition by MVN was overcome by addition of 1.2 mM mevalonic acid (MVA, Sigma, St Louis, MO).

Recombinant lamins

Full-length cDNA for human lamin A (McKeon et al., 1986) in a pUC9 vector was a generous gift from Dr F. McKeon, Harvard Medical School. The sequence starting from the initiator methionine to the end of the 3' non-coding sequence of lamin A was excised by digestion with *Nco*I and *Bam*HI and inserted into the corresponding sites of the T7 RNA polymerase promoter-based pET-IId vector (Studier et al., 1990; Novagen, Madison, WI). Expression of full-length lamin A in BL21(DE3) pLysS bacteria (Novagen) was induced by the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside.

Truncated lamin A expression vectors were constructed using the polymerase chain reaction and subcloned into the TA cloning vector (Invitrogen, San Diego, CA). All polymerase chain reaction inserts were verified by automated DNA sequencing (ALF DNA sequencer, Pharmacia, Piscataway, NJ). A carboxyl-terminal deletion of 18 amino acids (CAI8) starting from Leu647 was prepared by inserting a stop codon followed by a *Bam*HI site immediately following the codon for Tyr646. This truncated lamin A corresponds to the mature form of lamin A found in mammalian cells (Weber et

al., 1989; see Fig. 1). An amino-terminal deletion mutant of 562 amino acids (N Δ 562) was prepared by inserting a *Nde*I site along with codons for two histidine residues upstream of His563 (see Fig. 1). This insertion provides an initiator methionine and codes for a final product with six consecutive histidine residues at its amino terminus, a feature used for subsequent purification (see below). This truncated lamin A (N Δ 562) corresponds to the unique carboxyl-terminal extension of lamin A and overlaps the sequence of lamin C only for four amino-terminal histidine residues (Fisher et al., 1986). Both constructs were inserted into the appropriately excised pET vector for expression as described above. Lamin A (N Δ 562) was expressed in BL21(DE3) bacteria (Novagen).

Purification of recombinant lamins

Full-length lamin A and lamin A (C Δ 18) were purified by preparative isoelectric focusing and continuous elution after sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as described (Gagnon et al., 1992). Briefly, whole bacterial lysates prepared by sonication in a final concentration of 8 M urea and cleared by ultracentrifugation were first fractionated on the basis of isoelectric point in the Rotofor apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). Fractions carrying lamins as identified by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining were, concentrated by dialysis and lyophilization and subsequently fractionated on the basis of their mobility in the PrepCell apparatus (Bio-Rad) using SDS-PAGE and continuous elution. Fractions carrying purified lamins were pooled, concentrated by ultrafiltration using Centriprep 10 devices (Amicon, Beverly, MA), precipitated with 90% (v/v) acetone overnight at -20°C (Achtstaetter et al., 1986), and recovered by centrifugation. Alternatively, purification of lamins was performed by electrophoresis of Rotofor fractions onto regular or mini slab gel apparatus. Gels were stained with Coomassie Blue in water and lamin bands were excised. Lamins were subsequently electroeluted and precipitated with acetone (see above). In

order to facilitate later resuspension of acetone-precipitated lamins, pellets were resuspended in water by sonication and subsequently lyophilized. Quantitation of lamins was performed by the Lowry procedure (Lowry et al., 1951) using 0.5 M NaOH to solubilize lamins and bovine serum albumin (BSA) standards. Alternatively, quantitation of small amounts of lamins was performed by visual comparison of Coomassie Blue staining intensity of lamin bands with the staining intensity of standards of BSA run on the same gel.

Lamin A (NΔ562) bearing a cluster of six histidine residues at its amino terminus was purified by metal chelate affinity chromatography on pre-packed chelating Sepharose cartridges (Pharmacia), loaded with 0.1 M NiCl₂ according to the manufacturer's instructions. Whole bacterial lysates were prepared by sonication in a final concentration of 8.8 M urea and cleared by ultracentrifugation. Prior to chromatography, the sample was adjusted to final concentrations of 6 M urea, 1 M NaCl and 20 mM sodium phosphate (chromatography buffer) adjusted at pH 7.5. The sample was loaded on the cartridge, which was sequentially washed with chromatography buffer at pH 7.5, 6.1 and 5.75. Elution was performed with chromatography buffer at pH 3.0, and fractions were immediately neutralized by addition of the appropriate amount of 5 M NaOH. EDTA was added to the fractions to prevent formation of multimers. Fractions carrying lamin A (NΔ562) were identified by Tricine-SDS-PAGE (Schägger and von Jagow, 1987), pooled, concentrated with Centricon 10 devices (Amicon) and electrophoresed for a final purification step by electroelution as described above.

Electrophoresis and immunoblotting

SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) or using Tricine (Sigma) as the trailing ion for low molecular mass proteins as described (Schägger and von Jagow, 1987). Conditions for electrophoretic transfer of proteins onto nitrocellulose sheets and immunodetection were as described (Raymond and Gagnon, 1988), except

that the transfer was performed at 100 volts for 1 hour and for the use of peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins instead of biotin and avidin conjugates. Where indicated, reactive bands on immunoblots were quantitated using a laser-based imaging densitometer (PDSI-MAC; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Indirect immunofluorescence

Cells grown on glass coverslips were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed for 5 minutes in methanol followed by 10 minutes in acetone, both at -20°C , and then air-dried. Alternatively, coverslips were washed with PBS, fixed in 3.7% (v/v) formaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature, washed in PBS and permeabilized with 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS for 15 minutes at room temperature and immediately processed for immunofluorescence without any drying step. Indirect immunofluorescence was performed as described (Collard et al., 1992). Primary antibodies included 1E4 monoclonal antibody (mAb; 1/1000) reactive against shared epitopes of lamins A and C (Loewinger and McKeon, 1988), kindly provided by Dr F. McKeon, 133A2 mAb (1/1000) directed against an epitope in the carboxyl-terminal domain of lamin A that is absent from lamin C (Fisher et al., 1986), raised in our laboratory (Hozák et al., 1995), and a mouse antiserum (S4; 1/100) reactive against the precursor form of lamin A (this study). The latter antiserum was raised by immunizing Balb/c mice with purified recombinant lamin A (NΔ562). A primary intraperitoneal injection of 50 μg protein in complete Freund's adjuvant was followed by a second injection of 50 μg after two weeks, in incomplete Freund's adjuvant. Four months later, a final intravenous injection of 50 μg in PBS was performed and blood was collected by cardiac puncture after a 7 day interval. Non-immune serum was prepared from a mouse (S6) purchased simultaneously but which had not received any injection.

The S4 antiserum was used after adsorption onto lamin A (CA18) transferred onto nitrocellulose sheets, at a ratio of 1 μg of adsorbent per μl of undiluted antiserum. The nitrocellulose sheet was blocked with 6% (w/v) BSA in PBS for 1 hour at 37°C after which the antiserum at a dilution of 1/50 in 3% BSA-PBS was incubated with the nitrocellulose fragment for 4 hours at 37°C. After adsorption, the antiserum samples were stored at 4°C. Alternatively, adsorption experiments using lamins in suspension were performed as described (Collard et al., 1992), using a ratio of 100 μg of adsorbent per μl of undiluted antiserum.

The second antibody was fluorescein-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) used at a dilution of 1/100. This second antibody was used after adsorption onto HEp-2 whole cell lysates immobilized on AminoLink columns (Pierce, Rockford, IL), following the manufacturer's instructions, to reduce non-specific binding. Following PBS washes, coverslips were mounted onto microscope slides in 50% (v/v) glycerol in PBS, which, when required, contained 2.5% (w/v) 1,4-diazobicyclo[2.2.2]-octane (DABCO, Sigma). Fluorescence was observed with a Zeiss epifluorescence microscope and photographed using Kodak TMZ-P3200 film. Where indicated, fluorescence was viewed on a Bio-Rad MRC 600 confocal laser scanning microscope and photographed using Kodak Tri-X 400 film.

Triton extractions were performed on cells grown on coverslips, following protocols adapted from Staufienbiel and Deppert (1984) and Chaly et al. (1985). Cells were first washed for 4 minutes at room temperature followed by 4 minutes on ice in extraction buffer (0.25 M sucrose, 10 mM morpholinoethanesulfonic acid, 2 mM MgSO_4 , 25 mM KCl, pH 6.2, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) containing 1 mM EGTA. Cells were subsequently incubated in extraction buffer containing 1 mM EGTA and 5 mM dithiothreitol in the presence or absence of 0.5% (v/v) Triton X-100 for 3 minutes followed by 25 minutes on ice. Cells were then washed twice in extraction buffer for 3 minutes on ice, once in PBS, and fixed as above.

RESULTS

A mouse serum specific to the lamin A precursor

Mice were immunized with recombinant truncated lamin A (N Δ 562) (see Fig. 1) to raise antibodies specific to the 98 amino acid carboxyl-terminal domain of lamin A (residues 567-664) that distinguishes it from lamin C (Fisher et al., 1986). One serum (S4) was found to react against the immunizing recombinant antigen, which bears the full-length carboxyl terminus of lamin A, but not against mature lamin A from human HEp-2 cells (see below). Therefore, the possibility existed that the S4 antiserum was specific to the 18 amino acid extension of full-length lamin A that is cleaved and, thus, absent from the carboxyl terminus of mature lamin A (see Fig. 1).

To test this hypothesis, HEp-2 cells were treated with MVN, an inhibitor of isoprenylation, to force the accumulation of unprocessed and uncleaved lamin A precursor, which is otherwise undetectable on blots due to its low steady-state amount in normal cells (Beck et al., 1990). As shown in Fig. 2A, the 1E4 mAb reactive against shared domains of lamins A and C (Loewinger and McKeon, 1988), detected mature lamin A and lamin C in untreated cells (lane 1). In MVN-treated cells, an additional band of lower apparent mobility than mature lamin A that corresponds to the mobility of the lamin A precursor (Laliberté et al., 1984; Gerace et al., 1984; Beck et al., 1990) was detected by 1E4 (Fig. 2A, lane 2). When isoprenylation was resumed by addition of excess MVA to MVN-treated cells, the lamin A precursor became undetectable (Fig. 2A, lane 3), as described (Beck et al., 1990). In contrast, as shown in Fig. 2B, the S4 antiserum reacted exclusively against the lamin A precursor band present in MVN-treated cells (lane 2) and not against mature lamin A nor lamin C. It is to be noted also that no other band from the total HEp-2 cell lysate was recognized by the S4 antiserum (Fig. 2B). A control serum (S6) from a non-immunized mouse did not react with any protein present in the HEp-2 cell lysate (Fig. 2C).

The specificity of the S4 antiserum was further tested on immunoblots bearing equal amounts of purified recombinant full-length lamin A and truncated lamin A (C Δ 18). This truncated lamin A corresponds to the sequence of mature lamin A as found in vivo (Weber et al., 1989; see Fig. 1). Coomassie Blue staining (Fig. 3A) and immunodetection with the 1E4 mAb (Fig. 3B), performed on parallel lanes from the same electrophoresis run, clearly showed that the two forms of lamin A were present in equal amounts. As expected, the S4 antiserum reacted strongly against full-length lamin A (Fig. 3C, lane 1) but, surprisingly, it reacted also weakly against truncated lamin A (C Δ 18) (Fig. 3C, lane 2). The latter reactivity was determined as being equivalent to 5% of the former, by densitometry. These results indicate that the S4 antiserum is principally directed against the 18 amino acid carboxyl-terminal portion of the precursor form of lamin A, but that some immunoglobulins are present that react with portions of lamin A located upstream from the proteolytic cleavage site of the lamin A precursor. The latter antibody activity was detected in this experiment (Fig. 3C) probably due to the presence of larger amounts of lamin A (C Δ 18) than the amount of mature lamin A present on the immunoblot of Fig. 2B.

Lamin A precursor is localized in intranuclear foci

Prior to indirect immunofluorescence tests, the S4 antiserum was adsorbed on purified lamin A (C Δ 18) immobilized onto nitrocellulose, as described in Materials and Methods. Eighty per cent of the reactivity seen on blots against lamin A (C Δ 18) was removed by this treatment. The adsorbed S4 antiserum gave a staining pattern of numerous small dots or foci located mainly over the nuclear space in a vast majority of cells both after fixation with organic solvents (Fig. 4A) and after fixation with formaldehyde without dehydration of the sample (data not shown). This pattern was similar to that obtained with unadsorbed S4 antiserum (data not shown). The nuclear foci pattern seen with the adsorbed S4 antiserum was absent from the staining pattern obtained

with the non-immune S6 antiserum (Fig. 4B). The background staining over the cytoplasm with the S4 antiserum (Fig. 4A) was probably non-specific as it was seen also with the non-immune S6 antiserum (Fig. 4B). The conjugated second antibody on its own gave only very weak staining with a slight emphasis on nucleoli (Fig. 4C). Thus, the lamin A precursor as detected by the S4 antiserum appears to be localized in the nucleus in the form of discrete foci. Confirmation of these results was obtained by competition experiments. The nuclear foci staining pattern of the preadsorbed S4 antiserum was abolished by preincubation of S4 with an excess of full-length lamin A in suspension (Fig. 5B). In contrast, incubation of preadsorbed S4 antiserum with an excess of lamin A (CA18) in suspension did not change the staining pattern (Fig. 5C, compare with Fig. 4A), indicating that the antibodies reactive against lamin A (CA18) on blots (see above) were not contributing significantly to the fluorescence pattern. Nevertheless, all the following experiments were performed with S4 antiserum preadsorbed on lamin A (CA18). Thus, nuclear foci represent the localization of the lamin A precursor.

Fig. 5A shows the nuclear rim staining typical of the nuclear lamina obtained with the lamin A and C specific 1E4 mAb (Loewinger and McKeon, 1988). The large amounts of lamins A and C detected by 1E4 in the peripheral lamina did not allow visualization of the lamin A precursor foci in all cells as detected by the S4 antiserum (compare with Figs 5C and 4A). This result indicates that the lamin A precursor foci appear enclosed within the peripheral lamina (see Fig. 6 below).

The distribution of lamin A precursor foci within the nucleus was studied using optical sectioning on the confocal laser scanning microscope. Fig. 6 shows a series of six images at 0.5 μm intervals throughout HEP-2 cells. Foci of lamin A precursor clearly appear distributed throughout the nuclear space. The majority of foci appear as small discrete spots, with some foci being traceable through a few sections. The presence of the lamin A precursor in intranuclear foci did not appear to be restricted to transformed human HEP-2 cells. A similar distribution of the lamin A precursor was

detected in non-transformed bovine epithelial cells (Madin-Darby bovine kidney cells) using the S4 antiserum (data not shown).

In order to establish that not all lamin A in HEp-2 cells is present in nuclear foci, cells were stained with the 133A2 mAb reactive against an epitope in the carboxyl-terminal domain of mature lamin A that is not found on lamin C (Hozák et al., 1995). Fig. 5D shows that mature lamin A is located in the peripheral lamina, with features identical to those seen for lamins A and C with the 1E4 mAb (Fig. 5A).

Occasionally, mAbs 1E4 and 133A2 gave patterns of fluorescence with strongly stained spots and fibers (upper cell in Fig. 5A and cells at left of Fig. 5D, respectively), reminiscent of those observed by others (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993). In contrast to the lamin A precursor foci recognized by S4 antiserum, the spots detected by 1E4 and 133A2 did not appear as discrete foci and were not seen in all cells (see Discussion).

Non-isoprenylated lamin A precursor is localized to intranuclear foci and nuclear periphery in MVN-treated cells

The very low amounts of lamin A precursor present in control cells did not allow study of the subsequent processing steps that lead to the formation and assembly of mature lamin A. Therefore, it was necessary to increase the amounts of precursor present by treating cells with the isoprenylation inhibitor MVN, as described above. As previously shown for other cell types, MVN treatment caused morphological changes such as cell rounding in HEp-2 cells (compare phase contrast images of cells in Figs 4 and 8), which reverted to a normal morphology after addition of MVA (data not shown; see Bifulco et al. 1993, and references therein).

Fig. 7 illustrates the localization of the lamin A precursor relative to that of mature lamin A and lamin C in MVN-treated cells and in cells recovering from the MVN block after addition of excess MVA. Fig. 7A,C,E and G shows that no major change

was detected in the distribution of mature lamin A and lamin C during the course of this experiment, indicating that MVN treatment did not give rise to a generalized disruption of the lamina (see Lutz et al., 1992). The lamin A precursor, detected by the preadsorbed S4 antiserum, maintained its presence in foci in MVN-treated cells (compare Fig. 7B and D) but showed most prominently a strong accumulation in the peripheral lamina (Fig. 7D). Thus, a block in the processing pathway of the lamin A precursor does not appear to interfere with its transport to the nucleus and to the nuclear lamina. It is noteworthy that the vast majority of the lamin A precursor, apart from the small amount present in foci, was localized to the lamina and not dispersed in the nucleoplasm (Fig. 7D). This result supports the suggestion that the lamin A precursor is assembled into the nuclear lamina (see below). Addition of an excess of MVA to MVN-treated cells led, after 60 minutes, to a detectable decrease of fluorescence over the lamina (Fig. 7F) and, after 4 hours, the lamin A precursor was present only in foci as in untreated cells (Fig. 7H, compare with Fig. 7B). The time course of disappearance of the lamin A precursor from the lamina of MVN-treated cells as detected by the S4 antiserum is exactly the same as that shown using biochemical methods on similarly treated cells (Beck et al., 1990).

These results were confirmed by competition experiments. Fig. 8 shows that the peripheral nuclear staining as well as the foci detected by S4 antiserum on MVN-treated cells (Fig. 8A) were abolished by preincubation of S4 antiserum with an excess of full-length lamin A (Fig. 8B; compare with immune S6 in Fig. 8D) but not with lamin A (CA18) (Fig. 8c).

Non-isoprenylated lamin A precursor is assembled in the lamina in MVN-treated cells

A direct test for assembly of lamins is the extraction of soluble proteins from cells with Triton detergent (Gerace et al., 1984). Fig. 9 shows the results of such an experiment on MVN-treated cells. The fluorescence patterns of lamins A and C detected by 1E4

mAb (Fig. 9A and B) or of lamin A detected by 133A2 mAb (Fig. 9E and F) were not affected by Triton extraction, as expected. Similarly, the lamin A precursor pattern detected by S4 antiserum remained the same after Triton extraction (Fig. 9C and D), indicating that the lamin A precursor is assembled in the nuclear lamina. However, the conditions used for *in situ* extraction of the cells (Staufenbiel and Deppert, 1984; Chaly et al., 1985) rendered the lamin A precursor foci almost undetectable, both with and without Triton extraction (Fig. 9C and D; compare with Fig. 7D). Furthermore, technical difficulties prevented us from testing the Triton solubility of lamin A precursor foci in untreated cells. Thus, the only conclusion that can be drawn from Triton extraction experiments is that the lamin A precursor accumulated in the lamina of cells under MVN treatment is assembled.

DISCUSSION

We have for the first time localized the endogenous lamin A precursor in untreated cells. The lamin A precursor is present in numerous intranuclear foci that are present in the vast majority of interphase cells in culture. Intranuclear distribution of lamins has been described previously (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993). However, these studies were not designed to distinguish between precursor and mature forms of lamin A (Goldman et al., 1992) or they were performed using antibodies directed against both lamins A and C (Bridger et al., 1993). Goldman et al. (1992) presented results in which microinjected full-length lamin A, which is presumably functionally equivalent to the lamin A precursor, was shown to transit via intranuclear foci prior to its assembly in the lamina. These latter results are consistent with our observations in the present paper. On the other hand, previous biochemical studies have shown that the newly synthesized lamin A precursor is modified and subsequently cleaved to the mature form with a half-life of 90-100 minutes, as part of a process that leads to final assembly in the lamina (Gerace et al., 1984; Beck et al., 1990). Taken together with these results, our findings support the suggestion that the lamin A precursor transits via intranuclear foci and is then transported to and assembled in the peripheral lamina. However, the extremely low amount of lamin A precursor in untreated cells did not allow us to determine its fate directly. We have been unable to 'chase' the lamin A precursor from the foci by treating cells with cycloheximide (data not shown), which would have supported the suggestion of a transient role for these foci. This may be due to a block in the processing pathway of the lamin A precursor following its passage through the foci. Alternatively, lamin A precursor foci may play a role in the cell and processing may be halted in the absence of newly synthesized lamin A input. Thus, the presence of the lamin A precursor in intranuclear foci is supported by two independent experimental approaches: direct visualization with a specific antibody in this study and

localization of microinjected full-length lamin A in Goldman's (1992) study. The role of these foci in processing of the lamin A precursor and the role of the precursor in these foci remain to be demonstrated.

There exists an important discrepancy between previous studies by Bridger et al. (1993), and the second part of the study by Goldman et al. (1992) and our present findings with respect to the cell cycle dependence of the intranuclear distribution of lamins. The former have both observed a strong G1 phase dependence for detection of lamin spots in human dermal fibroblasts and mouse 3T3 cells, respectively. For example, cell counts have determined that approximately 50% of cells in asynchronous populations display two or more lamin spots (Goldman et al., 1992). In our study, the vast majority of interphase human HEP-2 cells in asynchronous populations display the presence of numerous lamin A precursor foci. Furthermore, using cells synchronized by an MVN-induced block in G0 followed by release with MVA (Sinensky and Logel, 1985), we have not observed any change in the proportion of cells with lamin A precursor foci, at least within the first 24 hours after release from the block (data not shown). Lamin A precursor foci were also detected in non-transformed Madin Darby bovine kidney cells (data not shown). Therefore, the simplest explanation for the above discrepancy, assuming that there are no major differences in localization of lamin A precursor in the above three cell types, is that the amount of lamin A precursor is so low that it may not be detected by all anti-lamin A antibodies. This would leave only the G1 phase dependent spots with, presumably, a higher content of mature lamin to be detected. Alternatively, lamin A precursor foci may be detected by a number of antibodies to lamin A, but these foci may not be visible due to their low contrast relative to the more abundant mature lamin A. Consistent with the latter suggestion, we have also observed occasional lamin spots, using anti-lamin type A antibodies (see Fig. 5A and D), which were present on a minority of cells and, thus, shared characteristics similar to those previously reported (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993). Moreover,

these antibodies did not highlight the lamin A precursor foci over the much more abundant mature lamin A background. Therefore, we tentatively conclude that foci of lamin A precursor, detected in this study and in cells early after microinjection in Goldman's (1992) study, are distinct from the spots of mature lamins detected in Bridger's (1993) study, in the non-microinjected cells of Goldman's (1992) study and in occasional cells as shown here (Fig. 5A and D). Further work will be directed towards localization of the lamin A precursor by immunocytochemistry at the electron microscope level, and study of the appearance of lamin A precursor foci in differentiating cells (for example, in embryonal carcinoma cells: Lebel et al., 1987; Stewart and Burke, 1987).

In order to visualize processing of the lamin A precursor by indirect immunofluorescence, we forced its accumulation by MVN treatment and then released the block by addition of MVA. Since isoprenylation is the first and a requisite step in the processing pathway, its inhibition leads to accumulation of uncleaved precursor, which is detected by the S4 antiserum. Furthermore, as cleavage of the 15 amino acid carboxyl-terminal fragment appears to be the last step in the processing pathway, we may assume that the S4 antiserum is able to detect all intermediate forms of lamin A prior to cleavage to the mature form. This assumption can only be verified by the synthesis and individual testing with the S4 antiserum of these intermediate forms.

In MVN-treated cells, we have observed that the lamin A precursor was still present in foci but was mostly accumulated in a Triton-insoluble form in the peripheral nuclear lamina. These findings are consistent with previous results showing at least partial assembly in the lamina of non-isoprenylated lamin A (Krohne et al., 1989). In contrast with previous conclusions (Lutz et al., 1992), we do not find that the presence of the 18 amino acid carboxyl-terminal fragment of the lamin A precursor is an obstacle to its assembly in the lamina. Our data therefore indicate that isoprenylation does not appear necessary for assembly of the lamin A precursor. The discrepancy between our results and those of previous studies (see Introduction) may be attributable to the use in

the latter of very high levels of lamin A through overexpression. In our study, we have forced the accumulation of the lamin A precursor at a presumably more physiological rate and the cellular machinery may therefore be able to cope with this amount of unprocessed precursor, at least over the short time span of these tests (16-20 hours).

Our data do not allow us to determine whether, under conditions where isoprenylation is inhibited, the accumulated lamin A precursor has transited via the precursor foci or whether it has been directly transported to the lamina. An answer to this question would require antibodies that could distinguish between isoprenylated and non-isoprenylated lamin A precursor. The possibility exists that only isoprenylated lamin A precursor is transported to intranuclear foci, possibly by specific carrier molecules as described for other isoprenylated polypeptides (reviewed by Clarke, 1992), where it may play a specific role. For instance, intranuclear foci may be the site of formation of contacts between lamin A and heterochromatin that would lead to reorganization of the three-dimensional structure of chromatin, as lamin A would subsequently be transported to the peripheral lamina. Final processing of lamin A, i.e. cleavage of the 15 amino acid carboxyl-terminal fragment, may then occur in the lamina. This hypothesis will be tested by the search for nuclear elements that interact with the carboxyl-terminal domain of lamin A.

After isoprenylation was resumed by addition of MVA, the lamin A precursor was seen to disappear progressively from the lamina without any apparent translocation to other nuclear or cytoplasmic sites. The simplest interpretation of these results is that the lamin A precursor is processed in situ in the lamina to yield the final mature form no longer recognized by the S4 antiserum, a result consistent with previous biochemical observations (Gerace et al., 1984; Beck et al., 1990). Thus, all the enzymatic activities involved in this processing pathway would be present in the nuclear space. This has been directly demonstrated for a farnesyl-protein transferase (Sinensky et al., 1994b), and indirectly suggested for the endoprotease that removes the carboxyl-terminal three

amino acids (aaX; Jang et al., 1993). Further studies on the localization of the other enzymes in this pathway are necessary (see Pillinger et al., 1994, and references therein). These results also support the suggestion that the carboxyl-terminal 15 amino acid fragment of the lamin A precursor that bears the S4 epitope disappears from the cell. This could be due to proteolysis of the fragment, to a change in conformation making it undetectable by the S4 antiserum or to loss of this presumably soluble peptide through our fixation and immunofluorescence procedures.

The physiological significance of the removal of the isoprenylated 15 amino acid carboxyl-terminal fragment from the lamin A precursor is at present unclear. The only other known example is the yeast mating type factor, where, however, it is the isoprenylated fragment that bears the biological activity (for review, see Clarke, 1992). Whether the same may be true in the case of the lamin A carboxyl-terminal fragment can only be answered by direct experimentation. Lamin A reassembly after mitosis is not hampered by the absence of the isoprenylated carboxyl-terminal fragment. On the other hand, it is not established whether cells could live normally if they expressed in a stable fashion a non-cleavable lamin A precursor. This experiment would require replacement of the normal lamin A gene with a mutant of a single amino acid at the cleavage site (see Hennekes and Nigg, 1994). The only indication for a physiological role of the non-isoprenylated lamin A precursor comes from preliminary studies by Sinensky's group (Sinensky et al., 1994c). In that study, the lamin A precursor that accumulated under conditions where MVA was limiting was suggested to be one of the factors responsible for the ensuing cessation of DNA replication. Thus, the lamin A precursor would be at the crossroads between isoprenoid metabolism and cell cycle progression.

After submission of this manuscript, a study appeared describing an antiserum raised against a 15 amino acid peptide from the carboxyl-terminal portion of the lamin A precursor that reacted exclusively against the precursor and not mature lamin A (Sinensky et al., 1994a). This antiserum could not detect the lamin A precursor by

immunofluorescence on untreated cells although it could readily detect its accumulation in MVN-treated cells. This discrepancy with the results of the present study may be attributed to differences in sensitivity or in specificity of the antisera used. In favor of the latter, we note that the antigen used for the preparation of the S4 antiserum was over 100 amino acid long, thereby allowing some conformational restraint, and that it bore the CSIM sequence at its carboxyl terminus, in contrast to the 15 amino acid peptide without the CSIM sequence used by Sinensky et al. (1994a).

In this study, we have identified a second type of intranuclear lamin foci that are specific for the lamin A precursor. A number of nuclear components are organized as foci (for review, see Moir and Goldman, 1993; Spector, 1993) and our finding supports the concept of structural domains within nuclei where processing of nucleic acids such as DNA replication or of proteins is performed. Taken together with results showing intranuclear lamin spots in G1 cells (Goldman et al., 1992; Bridger et al., 1993) and immunolocalization of lamin A on the internal nucleoskeleton after chromatin removal (Hozák et al., 1995), our findings open up a completely novel and exciting area of experimentation with respect to the functional role of the nuclear lamins.

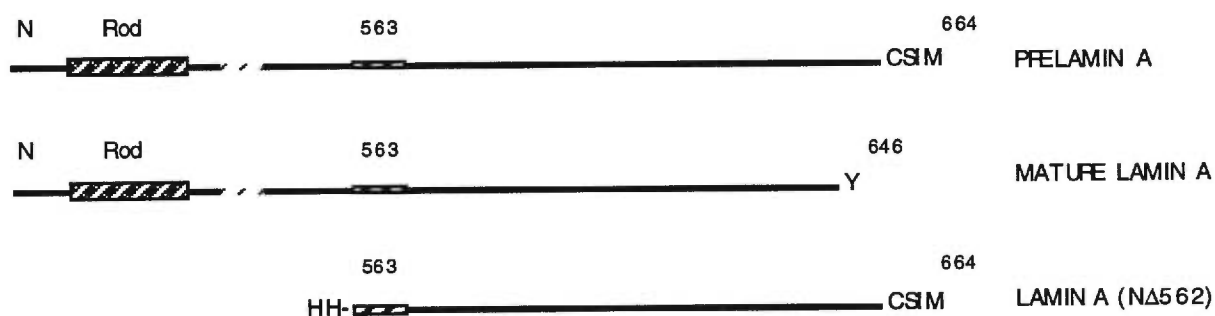


Figure 1 Schematic representation of lamin A precursor, mature, and truncated (NΔ562) forms.

The molecules are not drawn to scale: the rod domain has been shortened and emphasis is on the carboxyl-terminal domain. The small hatched box present on all three forms of lamin A represents the four-histidine cluster (residues 563-566). The carboxyl-terminal CSIM sequence of the lamin A precursor (prelamin A) represents the exact composition of the human lamin A CaaX box (Fisher et al., 1986). The carboxyl terminus of mature lamin A has been shown to be Tyr646 by direct protein sequencing (Weber et al., 1989). Recombinant truncated lamin A (CΔ18) prepared in this study is identical to the sequence of mature lamin A. Two histidine residues have been added to the amino terminus of lamin A (NΔ562) for purification purposes.

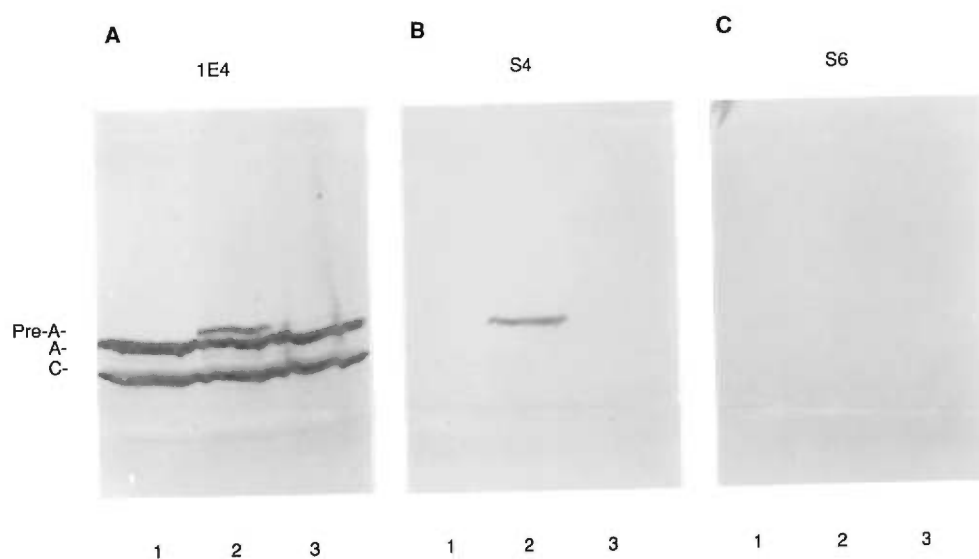


Figure 2 The S4 antiserum recognizes specifically the laminin A precursor.

HEP-2 cells were treated with 25 μ M MVN for 18 hours to inhibit isoprenylation and subsequently released from this inhibition by addition of 1.2 mM MVA and a further incubation for 4 hours. Lysates of untreated (lane 1), MVN-treated (lane 2) and MVN-MVA-treated (lane 3) cells (7.5×10^5 cells/lane) were separated by SDS-PAGE (8% polyacrylamide), transferred onto nitrocellulose and probed with 1E4 mAb (A) directed against lamins A and C, S4 antiserum (B), and non-immune S6 antiserum (C). The positions of the laminin A precursor (Pre-A) and of lamins A and C (A and C, respectively) are indicated at the left of A.

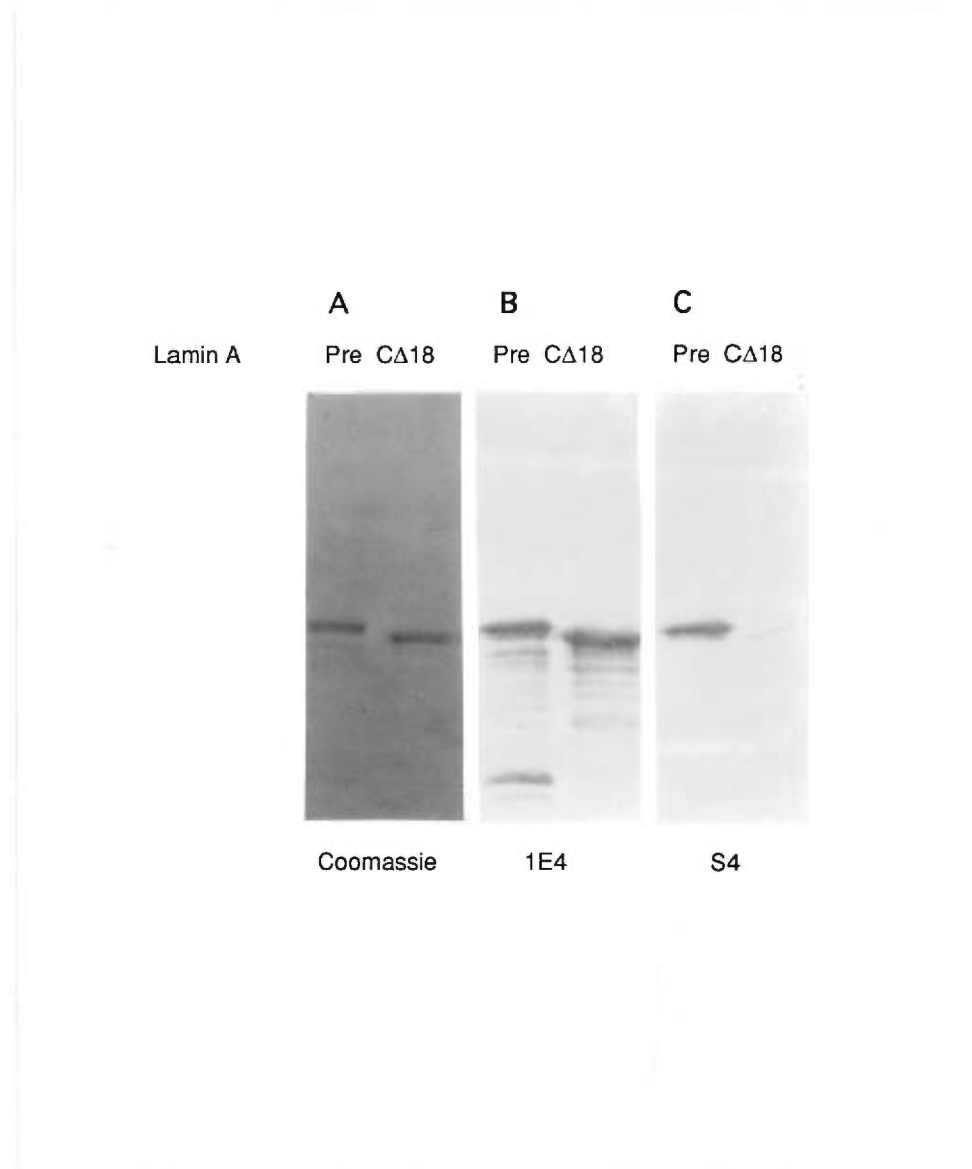


Figure 3 The S4 antiserum recognizes mainly the full-length form of recombinant lamin A.

Purified recombinant full-length (Pre) and truncated (CΔ18) lamin A (2 μg/lane) were separated by SDS-PAGE (8% polyacrylamide) on parallel lanes, which were subsequently cut and either stained with Coomassie Blue (A) or transferred onto nitrocellulose and probed with 1E4 mAb (B) directed against lamins A and C, or with S4 antiserum (C).

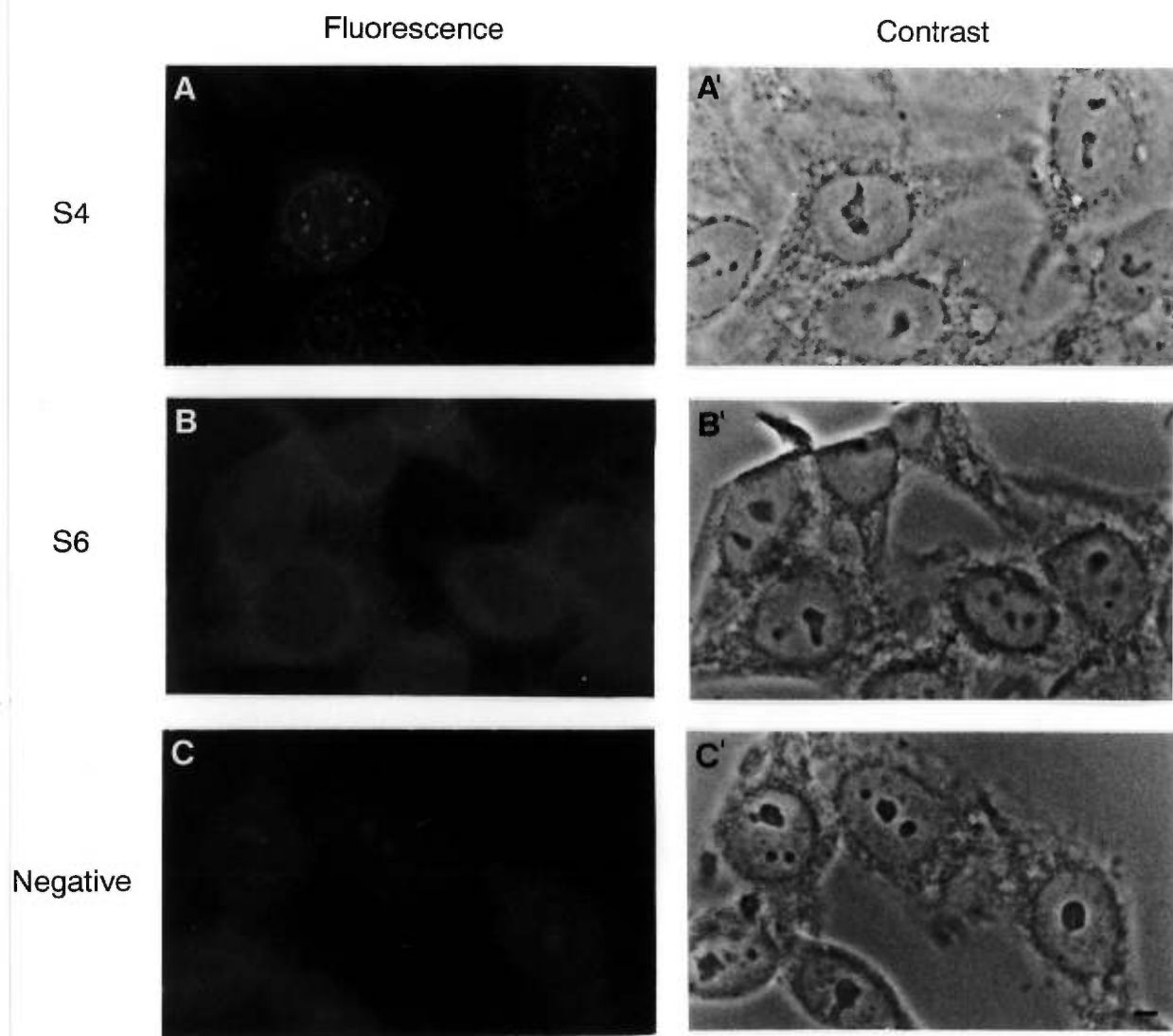


Figure 4 The lamin A precursor is present in nuclear foci.

Untreated HEp-2 cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence as described under Materials and Methods. (A) Fluorescence pattern obtained with S4 antiserum preadsorbed onto lamin A (C Δ 18); (B) the pattern obtained with the non-immune S6 antiserum; (C) the pattern with second antibody alone. (A'-C') The corresponding phase-contrast images. Bar, 4 μ m.

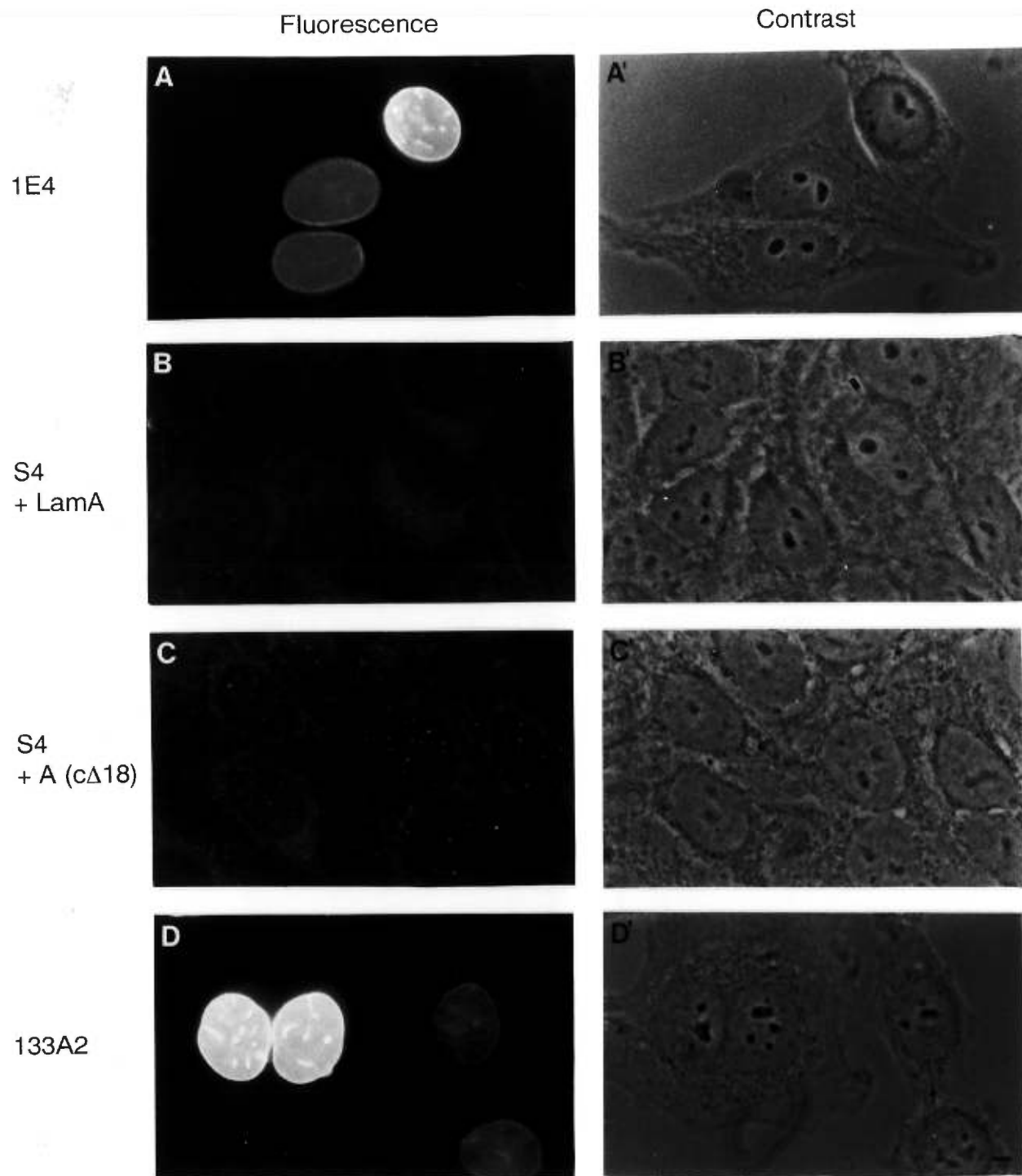


Figure 5 Competition with full-length lamin A abolishes the foci pattern of lamin A precursor.

Untreated HEp-2 cells were stained by indirect immunofluorescence using 1E4 mAb (A), S4 antiserum preincubated with full-length lamin A (B) or lamin A (CΔ18) (C), and 133A2 mAb (D) specific to lamin A. (A'-D') The corresponding phase-contrast images. Bar, 4 μ m.



Figure 6 Lamin A precursor foci are located within the nuclear space.

Untreated HEP-2 cells were stained by indirect immunofluorescence using S4 antiserum and viewed by confocal microscopy. Six consecutive optical sections were obtained at 0.5 μm intervals. Bar, 3 μm .

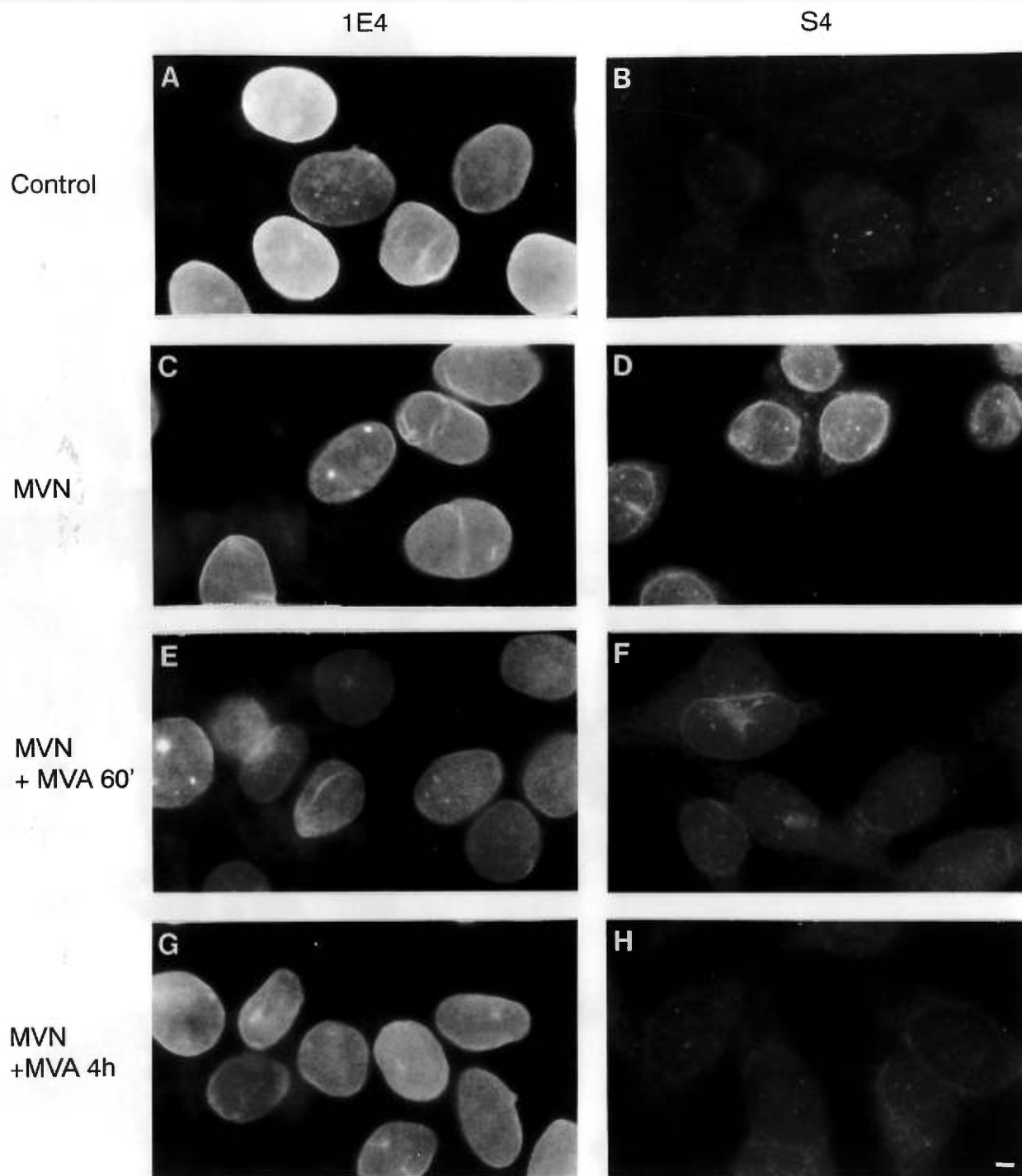


Figure 7 MVN treatment forces the accumulation of lamin A precursor in the peripheral lamina.

HEp-2 cells were either untreated (A,B) or treated with MVN (C-H) followed by MVA for 60 minutes (E,F) or 4 hours (G,H) as described under Materials and Methods. (A,C,E,G) Fluorescence pattern obtained with 1E4 mAb. (B,D,F,H) Staining with S4 antiserum. Bar, 4 μ m.

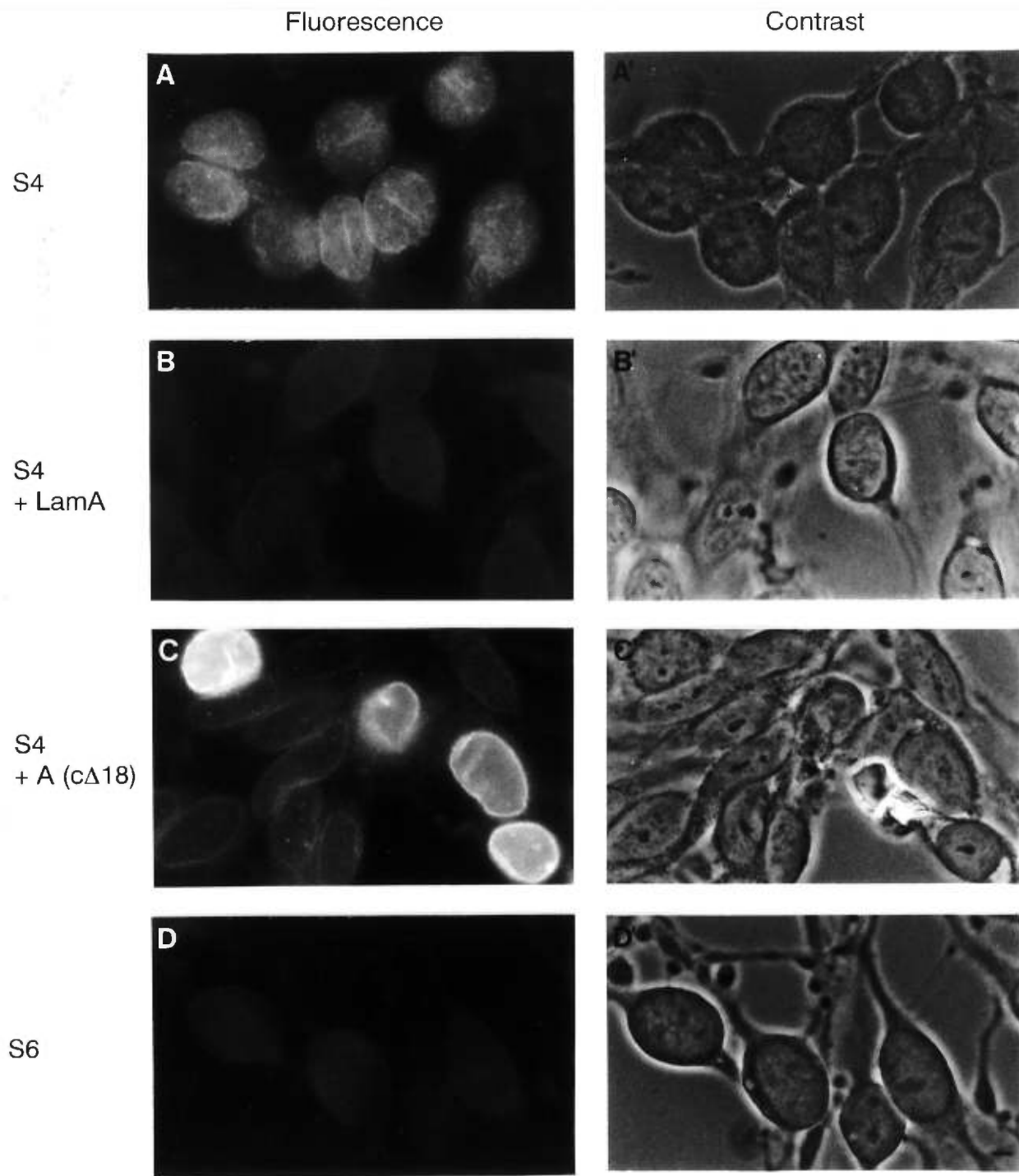


Figure 8 Competition with full-length lamin A abolishes the lamina and foci pattern of lamin A precursor.

HEp-2 cells were treated with MVN and stained with S4 antiserum (A) or S4 antiserum preincubated with full-length lamin A (B) or lamin A (CΔ18) (C). (D) Staining with the non-immune S6 antiserum. (A'-D') The corresponding phase-contrast images. Bar, 4 μm .

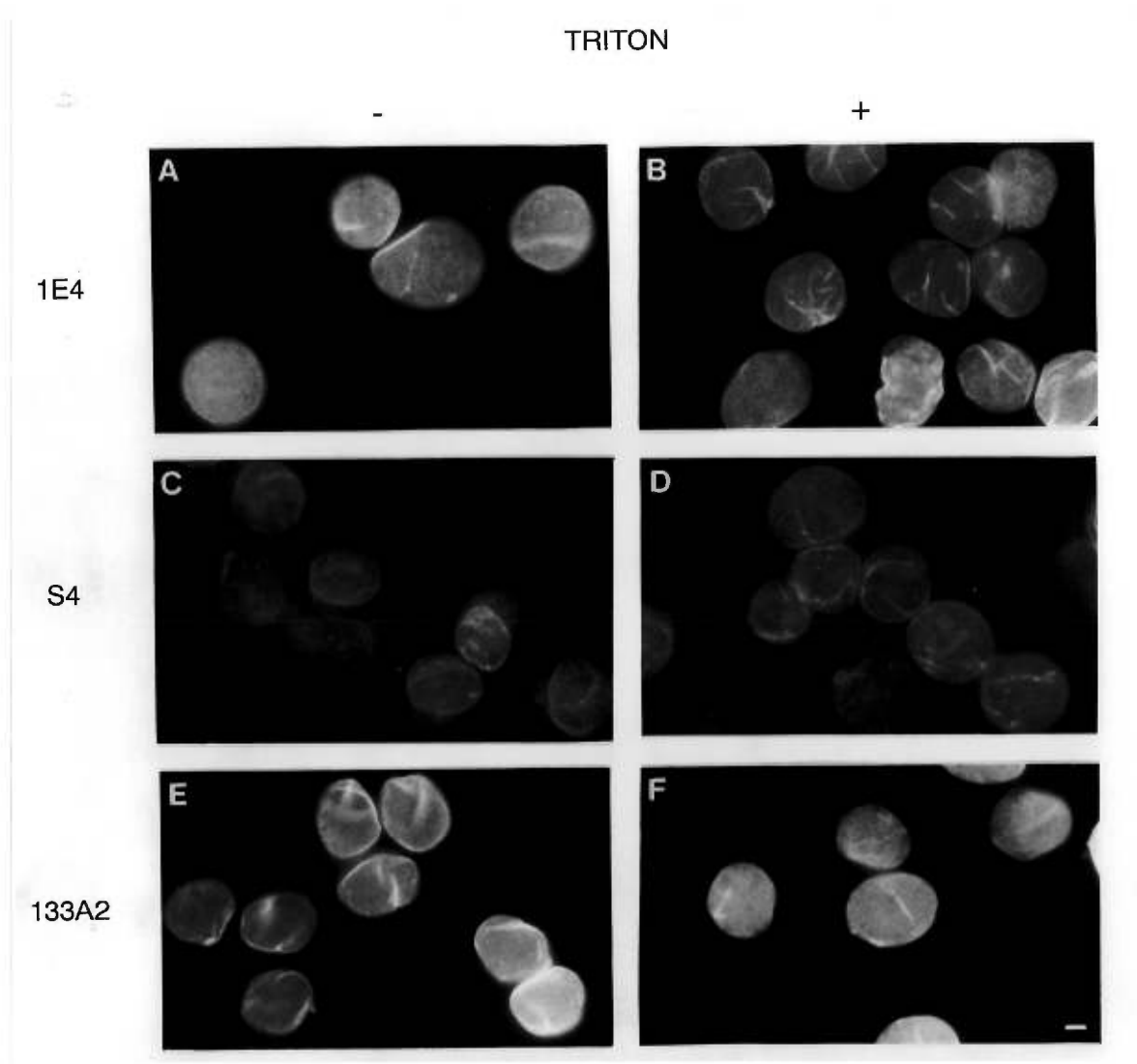


Figure 9 The lamin A precursor is assembled in the lamina of MVN-treated cells.

HEp-2 cells were treated with MVN and subjected to in situ extraction in the absence (A,C,E) or presence (B,D,F) of Triton detergent as described in Materials and Methods. The staining pattern of 1E4 mAb (A, B), S4 antiserum (C, D) and 133A2 mAb (E, F) are shown. Bar, 4 μ m.

We thank C. Boulanger, J. F. Cloutier, P. Hince and G. Gagnon for technical assistance, Dr R. Kothary for critical reading of the manuscript, Dr F. McKeon for the generous gift of lamin A cDNA and 1E4 mAb, Dr H. Brunengraber for a gift of mevinolin and Dr C. Desrosiers for a gift of mevalonic acid. We are most grateful to Dr Moïse Bendayan for the use of his confocal microscopy facilities, and particularly to Ping Chen for her technical assistance in all aspects of confocal microscopy and illustration. This study was supported by a studentship (A. M.-J. Sasseville) and a grant from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

- Achtstaetter, T., Hatzfeld, M., Quinlan, R. A., Parmelee, D. C. and Franke, W.W. (1986). Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Meth. Enzymol.* **134**, 355-371.
- Beck, L. A., Hosick, T. J. and Sinensky, M. (1990). Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J. Cell Biol.* **110**, 1489-1499.
- Bifulco, M., Laezza, C., Aloj, S. M. and Garbi, C. (1993). Mevalonate controls cytoskeleton organization and cell morphology in thyroid epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **155**, 340-348.
- Bridger, J. M., Kill, I. R., O'Farrell, M. and Hutchison, C. J. (1993). Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J. Cell Sci.* **104**, 297-306.
- Chaly, N., Little, J. E. and Brown, D. L. (1985). Localization of nuclear antigens during preparation of nuclear matrices in situ. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 644-653.
- Clarke, S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 355-386.
- Collard, J. F., Senécal, J. L. and Raymond, Y. (1992). Redistribution of nuclear lamin A is an early event associated with differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Cell Sci.* **101**, 657-670.
- Farnsworth, C. C., Wolda, S. L., Gelb, M. H. and Glomset, J. A. (1989). Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **264**, 20422-20429.
- Firnbach-Kraft, I. and Stick, R. (1993). The role of CaaX-dependent modifications in membrane association of *Xenopus* nuclear lamin B₃ during meiosis and the fate of B₃ in transfected mitotic cells. *J. Cell Biol.* **123**, 1661-1670.
- Fisher, D. Z., Chaudhary, N. and Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 6450-6454.
- Gagnon, G., Sasseville, A. M.-J. and Raymond, Y. (1992). Preparative 2-D electro phoresis system purifies recombinant nuclear proteins from whole bacterial lysates. *BioRad US/EG Bulletin* 1773, Hercules, CA.
- Gerace, L. and Burke, B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 335-374.

- Gerace, L., Comeau, C. and Benson, M.** (1984). Organization and modulation of nuclear lamina structure. *J. Cell. Sci. Suppl.* **1**, 137-160.
- Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. and Goldman, R.D.** (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **119**, 725-735.
- Habenicht, A. J. R., Glomset, J. A. and Ross, R.** (1980). Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **255**, 5134-5140
- Hennekes, H. and Nigg, E. A.** (1994). The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. *J. Cell Sci.* **107**, 1019-1029.
- Holtz, D., Tanaka, R. A., Hartwig, I. and McKeon, F.** (1989). The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**, 969-977.
- Horton, H., McMorrow, I. and Burke, B.** (1992). Independent expression and assembly properties of heterologous lamins A and C in murine embryonal carcinomas. *Eur. J. Cell Biol.* **57**, 172-183.
- Hozák, P., Sasseville, A. M.-J., Raymond, Y. and Cook, P.** (1995). Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J. Cell Sci.* **108** (in press).
- Jang, G. F., Yokoyama, K. and Gelb, M. H.** (1993). A prenylated protein specific endoprotease in rat liver microsomes that produces a carboxylterminal tripeptide. *Biochemistry* **32**, 9500-9507.
- Kitten, G. T. and Nigg, E. A.** (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear-membrane association of lamin B₂. *J. Cell Biol.* **113**, 13-23.
- Krohne, G., Waizenegger, I. and Hiiger, T. H.** (1989). The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelop. *J. Cell Biol.* **109**, 2003-2011.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laliberté, J. F., Dagenais, A., Filion, M., Bibor-Hardy, V., Simard, R. and Royal, A.** (1984). Identification of distinct messenger RNAs for nuclear lamin C and a putative precursor of nuclear lamin A. *J. Cell Biol.* **98**, 980-995.

- Lebel, S., Lampron, C., Royal, A. and Raymond, Y.** (1987). Lamins A and C appear during retinoic acid-induced differentiation of mouse embryonal carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **105**, 1099-1104.
- Lehner, C. F., Fiirstenberger, G., Eppenberger, H. M. and Nigg, E. A.** (1986). Biogenesis of the nuclear lamina: in vivo synthesis and processing of nuclear protein precursors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 2096-2099.
- Lin, F. and Worman, H. J.** (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **268**, 16321-16326.
- Loewinger, L. and McKeon, F.** (1988). Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J.* **7**, 2301-2309.
- Lourim, D. and Krohne, G.** (1993). Membrane-associated lamins in *Xenopus* egg extracts: identification of two vesicle populations. *J. Cell Biol.* **123**, 501-512.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lutz, R. J., Trujillo, M. A., Denham, K. S., Wenger, L. and Sinensky, M.** (1992). Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 3000-3004.
- Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S. and Lee, W. H.** (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 418-422.
- McKeon, F. D., Kirschner, M. W. and Caput, D.** (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**, 463-468.
- Moir, R. D. and Goldman, R. D.** (1993). Lamin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 408-411.
- Nigg, E. A.** (1992). Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin. Cell Biol.* **3**, 245-253.
- Pillinger, M. H., Volker, C., Stock, J. B., Weissmann, G. and Philips, M. R.** (1994). Characterization of a plasma membrane-associated prenylcysteine directed a carboxyl methyltransferase in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **269**, 1486-1492.
- Raymond, Y. and Gagnon, G.** (1988). Lamin B shares a number of distinct epitopes with lamins A and C and with intermediate filament proteins. *Biochemistry* **27**, 2590-2597.

- Schägger, H. and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Sinensky, M. and Logel, J.** (1985). Defective macromolecule biosynthesis and cell-cycle progression in a mammalian cell starved for mevalonate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**, 3257-3261.
- Sinensky, M. and Lutz, R. J.** (1992). The prenylation of proteins. *BioEssays* **14**, 25-31.
- Sinensky, M., Fantle, K. and Dalton, M.** (1994a). An antibody which specifically recognizes prelamin A but not mature lamin A: application to detection of blocks in farnesylation-dependent protein processing. *Cancer Res.* **54**, 3229-3232.
- Sinensky, M., Fantle, K., Trujillo, M., McLain, T., Kupper, A. and Dalton, M.** (1994b). The processing pathway of prelamin A. *J. Cell Sci.* **107**, 61-67.
- Sinensky, M., McLain, T. and Fantle, K.** (1994c). Expression of prelamin A but not mature lamin A confers sensitivity of DNA biosynthesis to lovastatin on F9 teratocarcinoma cells. *J. Cell Sci.* **107**, 2215-2219.
- Spector, D. L.** (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 265-315.
- Staufenbiel, M. and Deppert, W.** (1984). Preparation of nuclear matrices from cultured cells: subfractionation of nuclei in situ. *J. Cell Biol.* **98**, 1886-1894.
- Stewart, C. and Burke, B.** (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* **51**, 383-392.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89.
- Weber, K., Plessman, U. and Traub, P.** (1989). Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett.* **257**, 411-414.

(Received 22 July 1994 - Accepted 13 September 1994)

3 INTERACTION *IN VITRO* DU DOMAINE C-TERMINAL DE LA
LAMINE A AVEC L'ACTINE.

IN VITRO INTERACTION OF THE CARBOXY-TERMINAL DOMAIN OF LAMIN A WITH
ACTIN.

A. M.-J. Sasseville and Y. Langelier.

FEBS Letters, **425** (1998) 485-9

Les résultats non présentés décrits dans l'article à la page 135, concernant l'essai de
liaison sur membrane, sont illustrés à l'annexe II (page xix)

Abstract

The nuclear lamina formed by lamins is localized between the inner nuclear membrane and chromatin. Lamins are thought to be implicated in the higher order chromatin structure. Interactions of lamins with chromatin have been described but the molecular components directly involved in these interactions remain to be identified. Using a GST-C-terminal domain of lamin A fusion protein to probe cellular extracts for interacting proteins, we have found that this domain of lamin A binds to nuclear actin. This result suggests that an actin-based molecular motor linked to the lamina could be involved in the movement of chromatin domains.

Key words: Lamin; Actin; Protein Interaction

Abbreviations:

GST: Glutathione *S*-transferase

mAb: monoclonal antibody

NP-40: Nonidet P-40

1. Introduction

The nuclear lamina is a filamentous meshwork of proteins called lamins underlying the nuclear membrane of all eukaryotic cells (for review, see [1]). Like other intermediate filament proteins, lamins possess three distinct domains: a central α -helical rod flanked by a N-terminal head and a C-terminal tail. Lamins are classified as A type and B type according to their sequence, biochemical properties and subcellular distribution in mitotic cells (for a review see [2]). B-type lamins are constitutively expressed while A-type lamin expression is regulated during development and differentiation ([3] and references therein). In mammalian cells, type A lamins consist of two polypeptides derived from a single gene through alternative splicing [4]. These polypeptides, called lamins A and C, share the first 566 amino acids and differ only by the length of their carboxyl termini, which are 98 and 6 amino acids, respectively [5].

Nuclear lamins were originally observed as a ring at the periphery of the nucleus. Structural studies suggested a close association between the lamina and the chromatin [6] and lamins have been proposed to play a role in higher order chromatin organisation [7]. More recently, both types of lamins have been found internally within nuclei in a variety of situation, namely, during G1 or S-phase of the cell cycle ([8] and references therein), in certain pathological states and when mutated or overexpressed ([9] and references therein). Lamin A is synthesized as a precursor [10] that is cleaved proteolytically during the course of its assembly in the lamina to give rise to a mature protein that is 18 amino acids shorter than its precursor [11]. The physiological role of this precursor which is predominantly localized in intranuclear foci [12,13] is unknown. Lamin A was also shown to be associated with a diffuse skeleton that extends throughout the interior of human nuclei [14]. This nucleoskeleton, when isolated in "physiological" conditions, retains replication and transcription activity. As lamin foci were shown to colocalize with sites of nuclear activity such as DNA replication [8],

it was speculated that these foci represent common nucleoplasmic domains and that lamins might be involved in their organisation [3].

Actin, which is the major constituent of microfilaments, plays an important role in cell shape, movement and structure. Recent studies clearly demonstrated the presence of actin, actin-related proteins and actin-binding proteins in nuclei but there is still ambiguity concerning the functional significance of these findings. Among the functions suggested for nuclear actin, it has been proposed that it could be an essential component of an intranuclear motor implicated in the dynamic repositioning of the chromatin domains or in the modification of the structural state of chromatin ([15] and references therein). Moreover, as actin was found associated with the nuclear matrix, it could be implicated with lamins in the organisation of the nuclear chromatin domains.

The interaction of A-type lamins with chromatin has been suggested by *in vivo* [16-20] and biochemical *in vitro* [16,21-24] studies. Some of these studies have shown that the unique C-terminal domain of lamin A could be implicated in these interactions [16] but the molecular component of chromatin involved has not yet been identified. The major limitation of *in vitro* studies using lamin molecules is the limited solubility of these proteins under physiological conditions. In this study, we have taken advantage of the increased solubility of the carboxy-terminal domain of lamin A relative to full-length lamin A to examine the binding of this domain to cellular proteins and we have found that this domain binds to nuclear actin.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and ³⁵S protein labeling

HEp-2 cells, human epitheloid carcinoma and A549 cells, human lung carcinoma, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Labeling was carried out as follows: cells grown in 100 mm plates, after having been washed twice with PBS, were incubated in methionine-free medium and 4 % FBS for 12 to 16 h and then with methionine-free medium with 0.5 % FBS and 150 μCi/ml Trans ³⁵S-label™ (ICN) for 6 to 8 h.

2.2. Protein expression

The expression vector pET lam A (NΔ562) coding for a lamin A with its N terminal 562 residues deleted was constructed as described [12]. The carboxyl-terminal deletion of 18 amino acids (CΔ18) starting from Leu647 was prepared by inserting a stop codon followed by a *Bam*HI site immediately following the codon for Tyr646 [25]. These truncated lamin A (NΔ562) and lamin A (NΔ562CΔ18) correspond to the unique carboxyl-terminal extension of prelamin A and mature lamin A respectively [25] (see fig. 1) and overlaps the sequence of lamin C only for four amino-terminal histidine residues [5]. The Glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins were constructed by the introduction of a *Bam*HI site into the *Nde*I site of the pET vector and the insertion of the *Bam*HI cDNA into the pGEX 2TK vector (Pharmacia). The induction of protein expression in BL21(DE3) *E. coli* (Novagen) was performed by the addition of 0.4 to 0.7 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to exponentially growing bacteria.

2.3. Protein purification

Lamin A (NΔ562) and lamin A (NΔ562CΔ18) bearing a cluster of six histidine residues at their amino terminus were purified by metal chelate affinity chromatography on pre-packed chelating Sepharose cartridges (Pharmacia) and by electroelution, as described earlier [12]. They were >95% free of bacterial proteins. Fusion proteins were purified by affinity for Glutathione Sepharose beads according to Pharmacia Biotech's instructions. Proteins were analysed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. The quantity of proteins produced was determined by comparison to a bovine serum albumin standard using a digital imaging system (IS-1000, α-Innotech). The purity of protein preparations was evaluated by densitometric scanning of a lane containing 10 μg of protein on coomassie blue stained gel and by immunoblot analysis to identify degradation products.

2.4. Electrophoresis and immunoblotting

SDS-PAGE was performed as described by Laemmli [26] or using Tricine (Sigma) as the trailing ion for low molecular mass proteins [27]. Conditions for electrophoretic transfer of proteins onto nitrocellulose sheets were as described [12]. An anti-lamin A/C mouse monoclonal antibody (mAb) (clone 1E4, [28]) and an anti-actin mouse mAb (clone C4 from ICN) were used as primary antibodies. Peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins were used as secondary antibodies. Detection was performed using chloronaphtol or chemiluminescence (ECL) (Amersham).

2.5. Subcellular fractionation

Cell cultures were trypsinized, washed twice with PBS and resuspended in 10 mM Tris/HCl pH 7.2, 10 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5 % Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 5 μg/ml leupeptin (buffer A). When cells were fractionated, the nuclei

were isolated according to the procedure described by Bridger et al. [29]. Briefly, cells were incubated in buffer A for 10 min on ice and then nuclei were released from the cells by homogenisation, using a tight-fitting pestle in a Dounce homogeniser. When more than 90 % of nuclei were free of cytoplasm, as evaluated by phase contrast microscopy, they were pelleted by centrifugation at 1000 g for 10 min. After removal of supernatant, the nuclei were delicately resuspended in buffer A and centrifuged through a 30% (w/v) sucrose cushion.

2.6. Detection of proteins interacting with the C-terminal domain of lamin A

For the blot binding assay, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose as described [12]. Membranes were blocked with 2 % casein (w/v) in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl for 1 h at 37 °C and then incubated with lamin A (NΔ562CΔ18) in the same buffer at a concentration of 25 µg/ml for 1 h at 37°C and then at 4°C overnight. The membranes were then washed in Tris/NaCl and the binding of the lamin A (NΔ562CΔ18) was detected with the 133A2 mAb specific for lamin A as described [14]. Interaction of fusion proteins with cellular fractions was based on the method described by Antinore [30]. Total, cytoplasmic or nuclear extracts in buffer A were brought to final concentration of 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40 (NP-40) and 10 mM dithiothreitol (DTT). All extracts were sonicated and then centrifuged for 10 min at 12000 g. Standard binding reaction conditions were as follows: 100 µl of supernatant (corresponding to 2.5×10^5 cells for total extract, 5.0×10^5 nuclei or cytoplasmic extract of 3.5×10^5 cells) were incubated with 40 µg of GST alone bound to the sepharose beads with rotation on a Labquake apparatus at 4°C. After 2 h, beads were pelleted at 500 g and the lysate was cleared again with GST. After this second 2 h clearing, beads were pelleted and the lysate was divided in two parts. One half was added to 20 µg of GST alone with beads and the second half was added to 20 µg of the fusion protein GST-lam A (NΔ562CΔ18) with beads. After overnight incu-

bation with rotation on a Labquake apparatus at 4°C, beads were pelleted and washed 3 times with Tris-NaCl/NP-40 and 3 times with Tris-NaCl prior to analysis by SDS-PAGE. When indicated the overnight incubation was performed in a final concentration of 0.5 or 1.0 M NaCl. For immunoblots, unlabeled lysates were incubated with the fusion proteins as described above.

3. Results and discussion

To study interactions between the C-terminal domain of lamin A and chromatin, we have taken advantage of the increased solubility of this domain of lamin A. As illustrated in fig. 1 A, the N-terminal deletion produces a protein free of the alpha-helical rod domain which normally allows lamins to form multimeric complexes. The purified truncated protein (N Δ 562C Δ 18) (fig. 1B, lane 1) exhibited in physiological buffer (Tris/NaCl) a workable solubility, more than 80 % of the protein being found in the supernatant after a 10 min spin in a microfuge (at 1 μ g/ μ l). A blot binding assay was first used to probe extracts from HEP-2 cells with lamin A (N Δ 562C Δ 18). A number of reactive polypeptides were detected, ranging from 12 to 200 kDa, including a \approx 43 kDa peptide (data not shown).

After those preliminary studies, we used the GST fusion protein system to detect proteins interacting with the C-terminal domain of lamin A in a more physiological binding assay. As can be seen in fig. 1B, the purified GST-Lam A (N Δ 562C Δ 18) contained, as identified by immunoblotting (not shown), two degradation products of 30 and 26 kDa (lane 3) whereas the unfused GST protein was undegraded (lane 2). ³⁵S labeled HEP-2 cell extracts were prepared, cleared with GST protein alone to remove non specific interactions (fig. 2, lane 2) and then incubated with GST alone (fig. 2, lane 3) or GST-lam A (N Δ 562C Δ 18) (fig. 2, lane 4). This first series of experiments allowed the detection of a number of proteins interacting specifically with GST-lam A (N Δ 562C Δ 18) (lane 4) and not with GST alone (lane 3). The more apparent band was observed at \approx 43 kDa.

The next question that we addressed was the cellular localization of the interacting proteins. If implicated in the interphase function of lamin A, such proteins should be localized in the nucleus. On the other hand, cytoplasmic proteins interacting with lamin A during mitosis could play a role in nuclear reassembly. Unfortunately, the

cellular fractionation described in the Material and Methods section did not give satisfactory results with HEp-2 cells. Among the other cell lines tested, we chose the A549 cells because good fractionation was achieved reproducibly. As seen on the coomassie blue stained gel of fig. 3, we obtained typical cytoplasmic and nuclear fractions. The immunoblot presented in fig. 3 shows that lamins are not degraded during the cell fractionation and that actin is found in both, the cytoplasmic and the nuclear fraction, as other have observed before ([15] and references therein). ³⁵S labeled A549 cells were fractionated and used as described above to identify proteins interacting with GST-lamin A (NΔ562CΔ18). Typical results of those experiments are shown in fig. 4. As extracts were first cleared with GST alone, no abundant bands were seen in the control lane with GST in either the total cell extract or the two subcellular fractions. As in the first series of experiments, the more apparent interaction of the fusion protein is with a protein of an apparent MW of 43 kDa and the interaction is more prominent in the nuclear fraction. As lamin A and actin have both been suggested as proteins implicated in higher order chromatin organisation, we tested if the 43 kDa interacting protein was actin. Unlabeled cellular fractions were incubated with the fusion proteins and bound proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose. Immunoblots were probed with an anti-actin mAb and visualized by chemiluminescence (ECL) (fig 5A). This experiment identified actin as a protein interacting with the C-terminal domain of lamin A fused to GST and not with GST alone. In those experiments, nuclear actin seems to bind to lamin A more than the cytoplasmic actin. This could be due to actin isoform differences between these two cellular compartments [31]. However, as these binding assays were not quantitative, this suggestion needs further experimentation. The stability of the lamin-actin interaction was tested by the addition of NaCl up to 1 M for the overnight incubation step. As shown in fig. 5B lanes 7 and 14, the interaction between these two proteins resists to this salt concentration.

The results presented here suggest a tight interaction between lamin A and actin, two important elements of the cytoskeleton. However, we cannot exclude from these experiments that the interaction between lamin and actin is indirect, involving either a third partner or a multiprotein complex. In a recent study, the presence of myosin I and actin in the nucleus was clearly demonstrated and the authors argue positively for the presence of molecular motors in the nucleus [32]. Others have provided evidence that actin [33] and lamin A [29] colocalized with condensed chromatin. An actin-based motor link to the lamina and lamina-associated proteins [34] could form a dynamic network which, by performing structural changes in chromatin, could be involved in the transduction of messages from the cytoskeleton to various genes. *In vivo* experiments must be done to confirm this hypothesis and to identify the other components of this chromatin/nuclear matrix pathway of signal transmission.

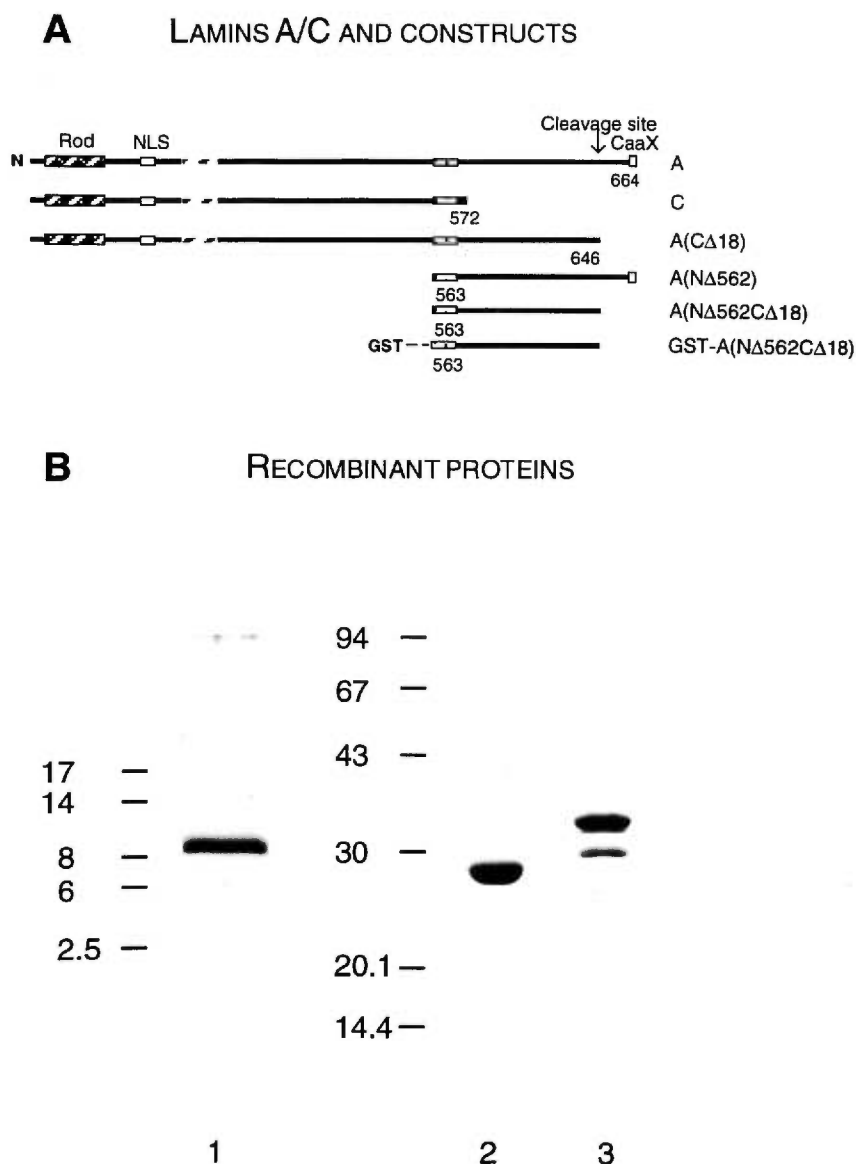


Figure 1 (A) Diagrams of lamin A and C and of lamin A deletion mutants. (B) Purified proteins.

(A) Schematic diagrams of lamin A and C (which is identical to lamin A except for 6 amino acids at the C terminus) and of lamin A deletion mutants. The diagrams are not drawn to scale, N termini being shortened to emphasize C termini. The box at residues 563-566 represents the four-histidine cluster, (B) Purified proteins. Lane 1, 5 μ g of N-terminal deletion mutant Lam A (N Δ 562C Δ 18) subjected to Tricine SDS-PAGE (10 % spacer gel / 16.5 % polyacrylamide resolving gel) and stained with Coomassie Blue. The 19 kDa band reacting in immunoblot with the 133a2 mAb (not shown) corresponds probably to a dimeric form. Lanes 2 and 3, 10 μ g of GST and GST-Lam A (N Δ 562C Δ 18) subjected to SDS-PAGE (12 % polyacrylamide) and stained with Coomassie Blue. The formation of dimers which occurred also with the GST-lam A (N Δ 562C Δ 18) was abolished by the addition of 1 % NP-40. Size (kDa) markers are indicated.

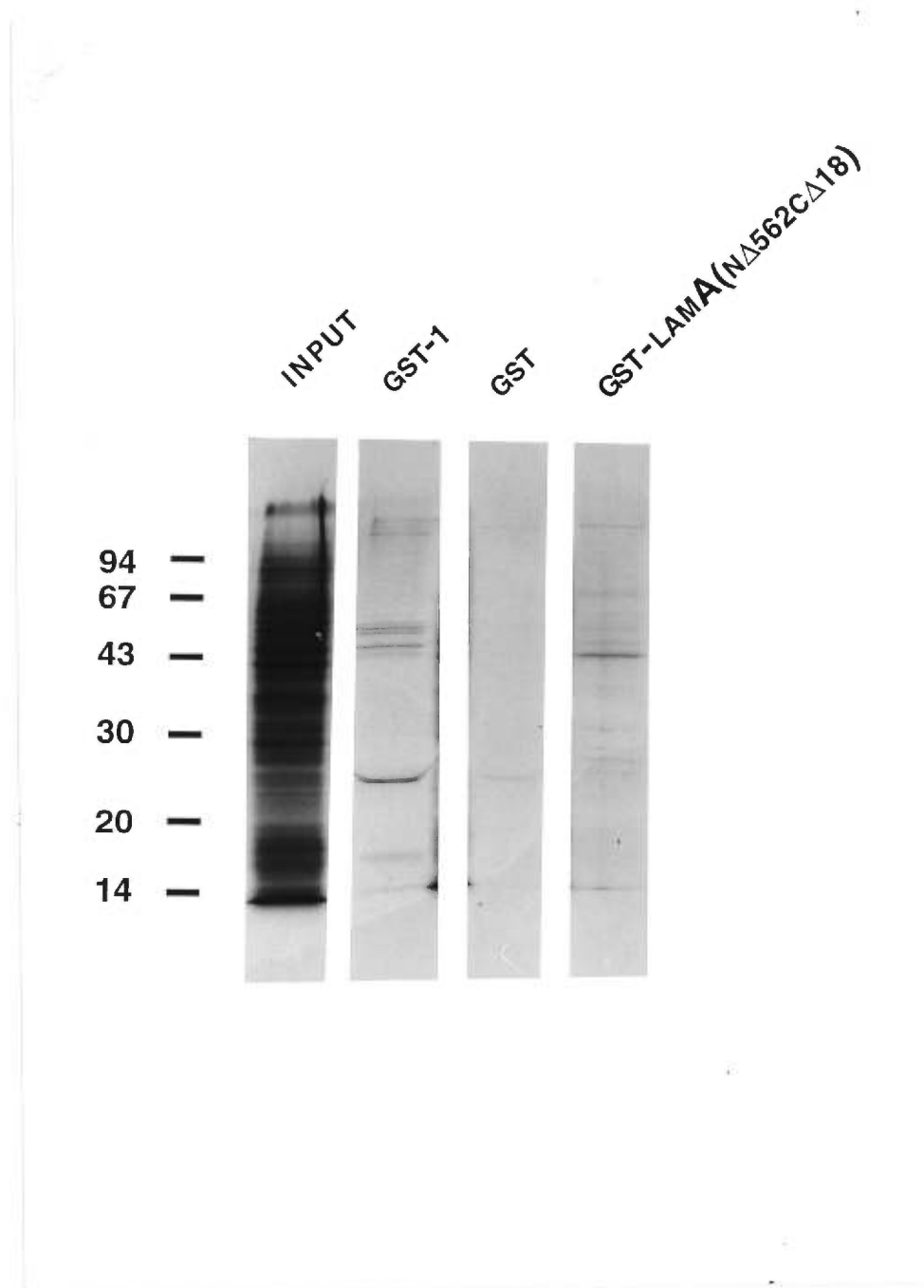


Figure 2 Interaction of HEp-2 cellular proteins with GST and GST-Lam A (NΔ562CΔ18).

The ^{35}S labeled bound proteins were subjected to SDS-PAGE (12 % polyacrylamide) and analysed by autoradiography. GST-1 lane, proteins that were cleared by the first interaction with GST-beads; GST lane, proteins that still interact with GST alone; GST-Lam A (NΔ562CΔ18) lane, proteins that interact with GST-Lam A (NΔ562CΔ18).

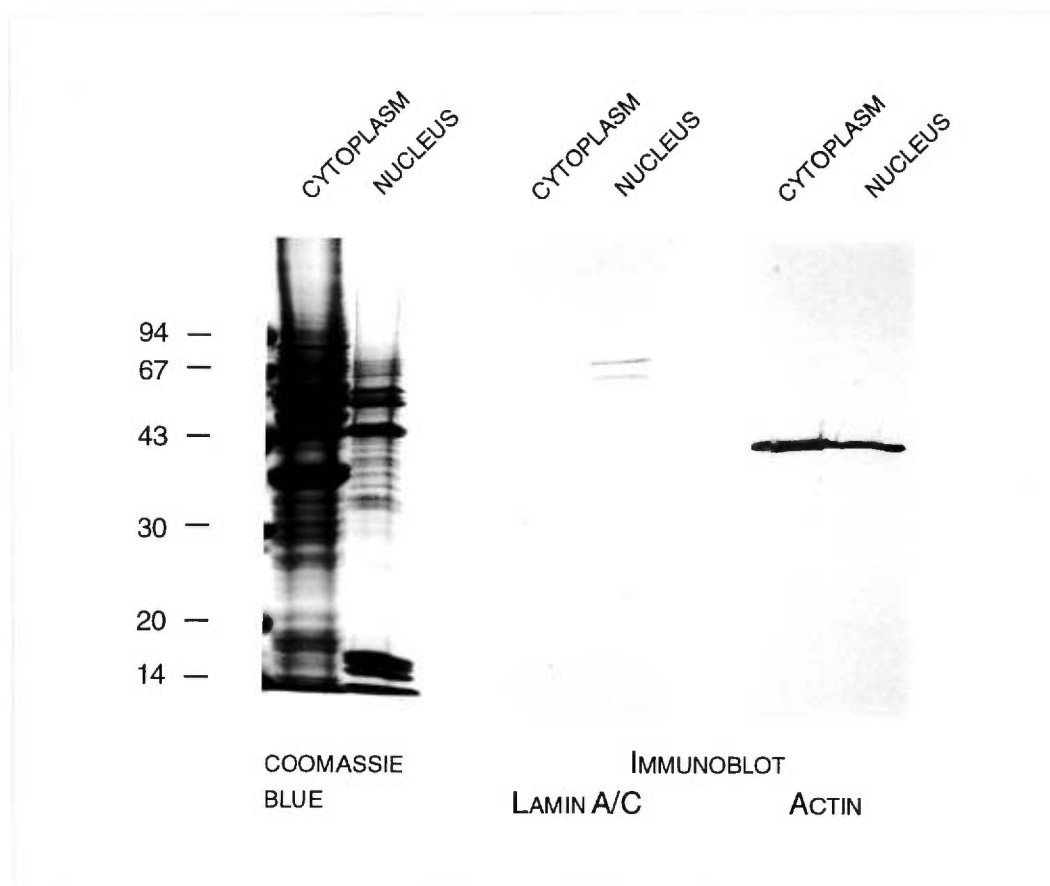


Figure 3 Subcellular fractionation.

Cytoplasm or nucleus of 5×10^5 A549 cells are shown. Proteins were stained with Coomassie blue (left) or transferred to nitrocellulose (right). Immunoblots were reacted with either anti lamin A/C antibody or anti actin antibody and revealed by chloronaphthol.

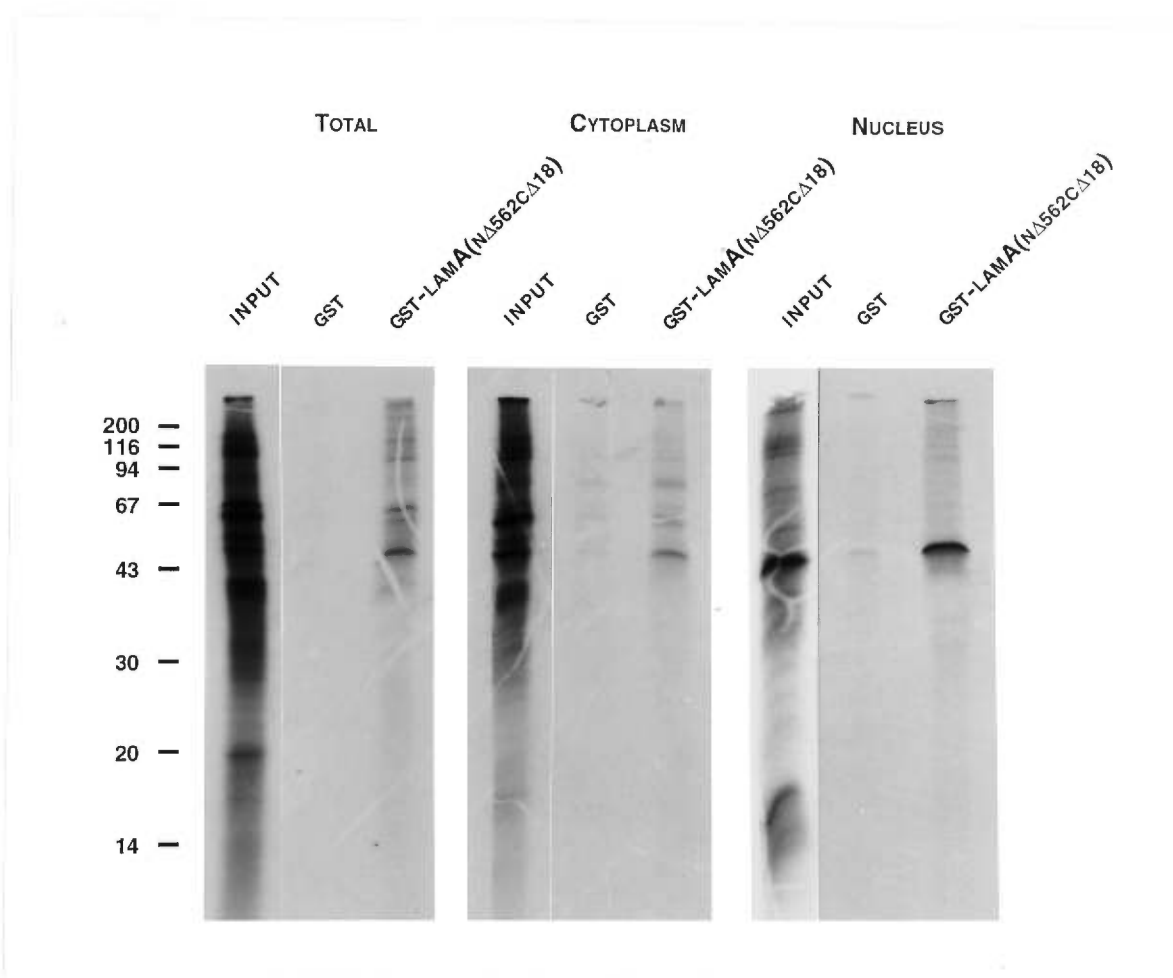


Figure 4 Interaction of proteins from subcellular fractions of A549 cells with GST and GST-Lam A (NΔ562CΔ18).

The ^{35}S labeled proteins bound to GST or GST-Lam A (NΔ562CΔ18) were subjected to SDS-PAGE (12 % polyacrylamide) and analysed by autoradiography.

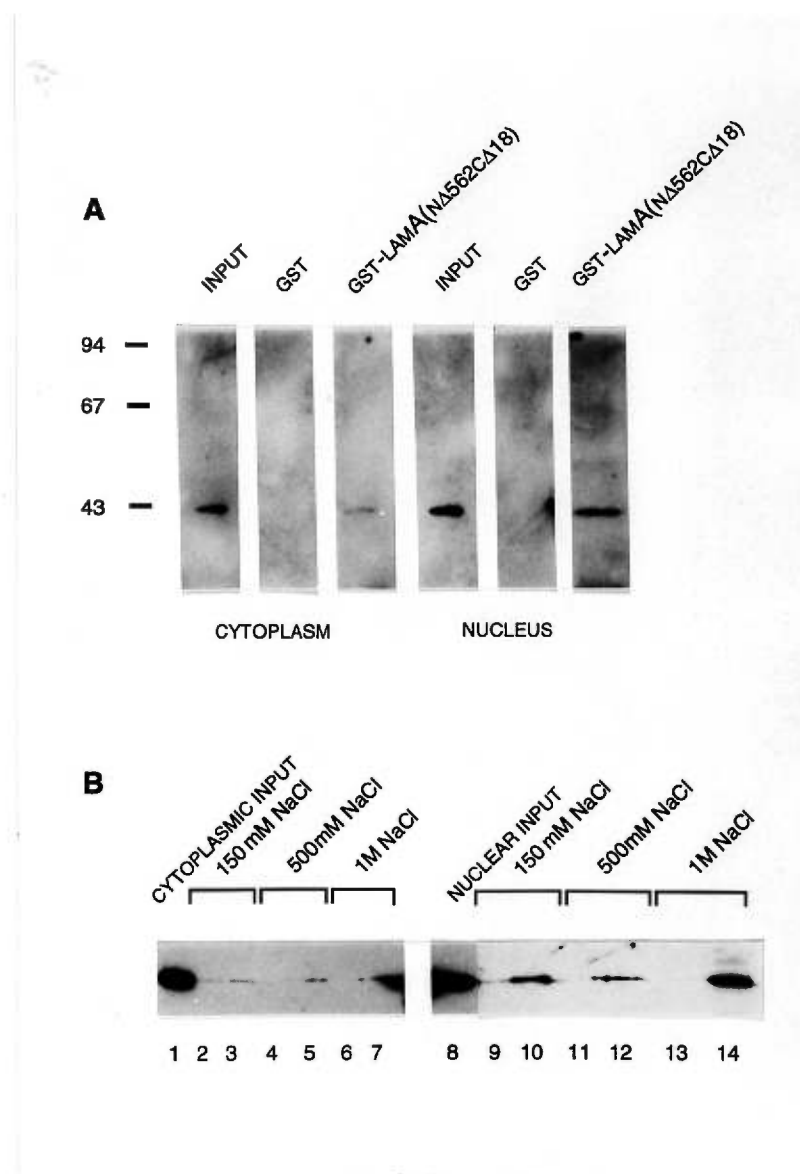


Figure 5 Identification of the 43 kDa protein interacting with GST-Lam A (NΔ562CΔ18) as actin.

Unlabeled lysates were incubated with either GST and GST-Lam A (NΔ562CΔ18) proteins as described in the Materials and Methods section and the interacting proteins were transferred to nitrocellulose and then probed with anti-actin mAb. Immunoblots were revealed by chemiluminescence (ECL). B) The actin-GST-Lam A (NΔ562CΔ18) interaction is resistant to high ionic strength. Incubations with either GST (lanes 2,4,6,9,11,13) or GST-Lam A (NΔ562CΔ18) (lanes 3,5,7,10,12,14) were done with cytoplasmic extract (lanes 1 to 7) and nuclear extract (lanes 8 to 14) in the presence of 0.15 M (lanes 2,3,9,10), 0.5 M (4,5,11,12) or 1 M (6,7,13,14) NaCl.

Acknowledgements: We thank Dr. F. McKeon for the gift of lamin A cDNA and 1E4 mAb. This study was supported by a studentship (A. M.-J. Sasseville) and a grant from the Medical Research Council of Canada.

References

- [1] Gerace, L. and Burke, B. (1988) *Annual Review of Cell Biology* 4, 335-74.
- [2] Nigg, E.A. (1992) *Seminars in Cell Biology* 3, 245-53.
- [3] Stick, R. (1995) in: *The Cytoskeleton, Structure And Assembly*, Vol. 1, pp. 257-296 JAI Press Inc.
- [4] Lin, F. and Worman, H.J. (1993) *Journal of Biological Chemistry* 268, 16321-6.
- [5] Fisher, D.Z., Chaudhary, N. and Blobel, G. (1986) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 6450-4.
- [6] Belmont, A.S., Zhai, Y. and Thilenius, A. (1993) *Journal of Cell Biology* 123, 1671-85.
- [7] Blobel, G. (1985) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 8527-9.
- [8] Moir, R.D., Montag-Lowy, M. and Goldman, R.D. (1994) *Journal of Cell Biology* 125, 1201-12.
- [9] Hennekes, H. and Nigg, E.A. (1994) *Journal of Cell Science* 107, 1019-29.
- [10] Laliberte, J.F., Dagenais, A., Fillion, M., Bibor-Hardy, V., Simard, R. and Royal, A. (1984) *Journal of Cell Biology* 98, 980-5.
- [11] Sinensky, M., McLain, T. and Fantle, K. (1994) *Journal of Cell Science* 107, 2215-8.
- [12] Sasseville, A.M. and Raymond, Y. (1995) *Journal of Cell Science* 108, 273-85.
- [13] Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. and Goldman, R.D. (1992) *Journal of Cell Biology* 119, 725-35.
- [14] Hozak, P., Sasseville, A.M., Raymond, Y. and Cook, P.R. (1995) *Journal of Cell Science* 108, 635-44.

- [15] Amankwah, K.S. and De Boni, U. (1994) *Experimental Cell Research* 210, 315-25.
- [16] Hoger, T.H., Krohne, G. and Kleinschmidt, J.A. (1991) *Experimental Cell Research* 197, 280-9.
- [17] Benavente, R. and Krohne, G. (1986) *Journal of Cell Biology* 103, 1847-54.
- [18] Collard, J.F., Senecal, J.L. and Raymond, Y. (1990) *Biochemical & Biophysical Research Communications* 173, 363-9.
- [19] Collard, J.F. and Raymond, Y. (1992) *Experimental Cell Research* 201, 174-83.
- [20] Schmidt, M. and Krohne, G. (1995) *European Journal of Cell Biology* 68, 345-54.
- [21] Burke, B. and Gerace, L. (1986) *Cell* 44, 639-52.
- [22] Yuan, J., Simos, G., Blobel, G. and Georgatos, S.D. (1991) *Journal of Biological Chemistry* 266, 9211-5.
- [23] Burke, B. (1990) *Experimental Cell Research* 186, 169-76.
- [24] Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L. (1995) *Journal of Cell Biology* 131, 33-44.
- [25] Weber, K., Plessmann, U. and Traub, P. (1989) *FEBS Letters* 257, 411-4.
- [26] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-5.
- [27] Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) *Analytical Biochemistry* 166, 368-79.
- [28] Loewinger, L. and McKeon, F. (1988) *EMBO Journal* 7, 2301-9.
- [29] Bridger, J.M., Kill, I.R., O'Farrell, M. and Hutchison, C.J. (1993) *Journal of Cell Science* 104, 297-306.
- [30] Antinore, M.J., Birrer, M.J., Patel, D., Nader, L. and McCance, D.J. (1996) *EMBO Journal* 15, 1950-60.
- [31] Bremer, J.W., Busch, H. and Yeoman, L.C. (1981) *Biochemistry* 20, 2013-7.

- [32] Nowak, G., Pesticdragovich, L., Hozak, P., Philimonenko, A., Simerly, C., Schatten, G. and Delanerolle, P. (1997) *Journal of Biological Chemistry* 272, 17176-17181.
- [33] Goldstein, L., Ko, C. and Errick, J. (1977) *Cell Biology International Reports* 1, 511-5.
- [34] Foisner, R. (1997) *Bioessays* 19, 297-305.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la lamine A. Il a été récemment démontré que la lamine A se retrouve localisée en foyers dans le noyau des cellules. La lamine A semble aussi être impliquée spécifiquement dans une interaction avec la chromatine. De plus, son processus de maturation, qui va de l'isoprénnylation du précurseur à la formation d'une protéine mature de plus faible poids moléculaire ayant perdu le groupement isoprényl, est inhabituel.

Nos travaux ont permis de montrer que la lamine A n'est pas localisée uniquement en périphérie nucléaire. Cette protéine se retrouve associée au squelette nucléaire. De plus, nous avons localisé pour la première fois le précurseur de la lamine A. Ce précurseur forme des foyers à l'intérieur du noyau. Nos études ont aussi permis d'observer que l'isoprénnylation transitoire de la lamine A n'est pas essentielle à son intégration dans la lamina et que, par conséquent, cette étape de la maturation de la protéine pourrait avoir un autre rôle insoupçonné jusqu'ici. Nous avons ensuite identifié l'actine comme protéine interagissant avec la lamine A.

1 ASSOCIATION ENTRE LA LAMINE A ET LE NUCLÉOSQUELETTE

Nous avons voulu préciser le rôle fonctionnel de la lamine A en étudiant d'abord sa localisation intranucléaire. La production d'un anticorps monoclonal (Acm) spécifique à la lamine A (l'Acm 133A2), i.e. dont l'épitope est localisé dans le domaine C-terminal unique à la lamine A, nous a permis d'entreprendre cette étude. Les travaux d'immunofluorescence indirecte, entrepris avec le 133A2, sur des cellules HeLa, HEp-2, MDBK et NIH 3T3, nous ont permis d'observer un marquage différent de celui habituellement observé avec un Ac dirigé contre les lamines A/C ou B. Cet Ac permettait de voir un marquage nucléoplasmique, en plus du marquage périphérique typique de la lamina. Ce marquage nucléoplasmique était plus visible sur les cellules MDBK qui ont un ratio lamine A/C inférieur à 1 (résultats non présentés). Nous avons

déterminé l'épitope de cet Ac, à l'aide de protéines recombinantes délétées en C-terminal. Il est localisé dans la région des résidus 598 à 611. Cet épitope est donc localisé à l'intérieur d'une région qui, selon certaines études *in vitro*, serait impliquée dans une interaction avec la chromatine [Hoger et al., 1991]. Cet anticorps ne reconnaît aucune autre protéine que les isovariants de la lamine A dans des extraits de cellules HEP-2 (annexe 1, fig. 1) ou des extraits nucléaires de cellule MDBK (résultats non présentés). La figure 1 illustre les principaux domaines de la lamine A qui ont été décrits dans l'introduction et qui seront discutés dans cette section.

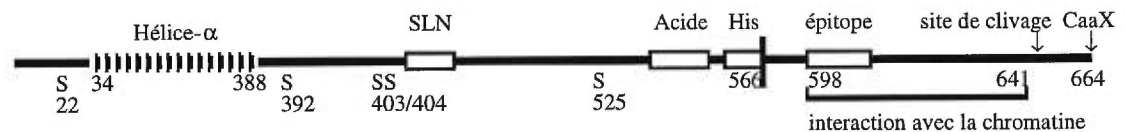


Figure 1 Schéma de la lamine A

Le schéma n'est pas à l'échelle. La région commune aux lamines A/C se termine à l'acide aminé 566. La phosphorylation des sérines 22 et 392 est impliquée dans le désassemblage des lamines et les sérines 403/404 dans le transport au noyau. L'effet de la phosphorylation de la sérine 525 par la PKC n'est pas connu.

Les boîtes représentent : le signal de localisation nucléaire, KKRKLE (417-422) ; la région acide : EDDEDED (551-557) ; le polyhistidine HHHH (563-566) et l'épitope de l'anticorps 133A2 (598-611). La région 598-641 serait impliquée dans l'interaction avec la chromatine. Le site de clivage du précurseur est situé après la Y 646.

Étant donné cette localisation de l'épitope, nous avons supposé que l'extraction de la chromatine pourrait augmenter la capacité de détection de cet Ac. Nous avons voulu observer en microscopie électronique des noyaux de cellules dont la chromatine avait été extraite dans des «conditions physiologiques», afin que les structures internes soient préservées. Pour ce faire, nous nous sommes associés à P. Cook, de l'Université d'Oxford. Ce groupe de recherche a mis au point une technique qui permet d'observer un nucléosquelette qui reste actif dans la transcription et la réplication. Ces travaux nous ont permis de montrer que la lamine A est associée au squelette nucléaire, en particulier au niveau des noeuds et des protubérances de celui-ci. En d'autres mots,

la lamine A est située au niveau des intersections entre ces filaments internes. Elle est ainsi favorablement positionnée pour exercer ou transmettre des tensions sur les filaments.

Malgré le fait que plusieurs groupes aient observé la présence de lamines dans le nucléoplasme [Bridger et al., 1993 ; Goldman et al., 1992 ; Mancini et al., 1994 ; Moir et al., 1994], l'association de la lamine A au nucléosquelette a d'abord été accueillie avec scepticisme [Gant et Wilson, 1997]. Les travaux d'autres groupes semblent maintenant venir confirmer nos résultats. Fricker et al. [1997] ont récemment observé, en utilisant un colorant lipophile (le DiOC₆), la présence de tubules membranaires dans les noyaux de plusieurs types cellulaires. Certains de ces tubules traverseraient le noyau au complet, alors que d'autres seraient associés aux nucléoles. Ces canaux seraient différents des repliements et invaginations de la membrane nucléaire. La membrane interne de ces canaux comporterait une lamina, comme la membrane nucléaire interne. Fricker et al. [1997] ont de plus observé des lamines intranucléaires qui ne sont pas associées aux membranes. Certains de ces sites riches en lamines étaient ponctuels alors que d'autres formaient des pistes étendues. Zhang et al. [1996a] ont démontré que l'assemblage de la lamina était nécessaire à la formation d'un réseau de filaments internes et de centres de réplifications fonctionnels. Cependant, la lamine B₃ ne semblait pas associée à ces filaments. L'ajout de lamine B₁ [Ellis et al., 1997] ou A [Spann et al., 1997], délétées de leur domaine N-terminal respectif, ont conduit au désassemblage de la lamina [Zhang et al., 1996a]. Dans ces expériences, la lamine A délétée de son domaine N-terminal inhibait aussi la synthèse d'ADN, vraisemblablement en altérant la distribution des facteurs requis pour la phase d'élongation de l'ADN. Ces observations, ajoutées à celles de Moir et al. [1994] sur la colocalisation de la lamine B avec les centres de réplification, permettent de présumer que le rôle des lamines de type A soit différent de celui des lamines de type B dans la formation et/ou le maintien des sites de réplification de l'ADN. Il a été démontré que les

sites de réplication sont associés au nucléosquelette [Hozak et al., 1993]. La lamine B pourrait être impliquée plus directement au niveau de la formation des centres de réplication, alors que la lamine A pourrait moduler la structure du nucléosquelette de façon à permettre et/ou à favoriser cette activité de réplication.

2 LA MATURATION DE LA LAMINE A *IN VIVO*

La microinjection de lamine A biotinylée a permis à Goldman et al. [1992] de suivre le cheminement de cette protéine entre le cytoplasme et la lamina nucléaire. Ces expériences ont démontré que ces protéines transitaient par des foyers intranucléaires préalablement à leur intégration dans la lamina. Leurs travaux, ainsi que ceux de Bridger et al. [1993], ont aussi permis l'observation de foyers de lamines de type A dans les noyaux des cellules, particulièrement pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Ces foyers pourraient représenter des accumulations de lamines qui serviront à la croissance des noyaux des cellules filles. La localisation en foyers est transitoire et pourrait aussi être reliée à la localisation d'intermédiaires dans le processus de maturation de la protéine. Les résultats obtenus par la microinjection de lamines A fluorescentes ont été interprétés différemment. Schmidt et al. [1994] affirment que les foyers qu'ils ont observé avec la lamine A fluorescente, ainsi que les foyers observés dans les cellules non-injectées, sont dus à des repliements de la membrane nucléaire. Pourtant, lorsqu'ils microinjectaient une lamine A mutante non-isoprénylable, *XeLamA(C⁶⁶²→S)-5-IAF*, i.e. qui reste sous forme de précurseur, ils observaient des foyers, une heure après la microinjection. Ils ont conclu que cette lamine mutante étaient incapable d'intégrer la lamina. Malheureusement, ces trois études ne permettaient pas de faire la distinction entre le précurseur et la lamine A mature car aucun de ces groupes ne possédait de marqueur spécifique à ce précurseur.

Nous avons produit un anticorps dont l'épitope se situe entre les a.a. 647 à 664. Cet Ac reconnaît le précurseur de la lamine A mais pas la lamine A mature. Cet Ac

nous a permis de localiser pour la première fois le précurseur de la lamine A. Ce précurseur est présent dans des foyers intranucléaires. Cependant, ces foyers semblaient plus petits ou plus discrets que les foyers observés pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Le fait qu'ils soient présents dans toutes les cellules d'une population non synchronisée peut signifier que leur présence n'est pas reliée au cycle cellulaire. La détection de cette faible quantité de précurseur avec des Acs anti-lamines A/C est probablement masquée par le fort signal de la lamine A mature.

La faible quantité de précurseur présent dans les cellules ne nous a pas permis de suivre son cheminement du stade précurseur au stade mature. Nous avons traité les cellules à la mévinoline afin d'accumuler le précurseur produit par les cellules. Le précurseur ainsi accumulé se retrouvait intégré dans la lamina et les foyers intranucléaires étaient maintenus. L'isoprénylation transitoire de la lamine A n'est donc pas nécessaire à son intégration dans la lamina et la présence des résidus 647 à 664 n'empêche pas cette intégration. Par conséquent, la localisation nucléoplasmique, observée dans les expériences de transfections de lamines A qui demeurent sous forme de précurseur [Hennekes et Nigg, 1994 ; Holtz et al., 1989 ; Krohne et al., 1989 ; Lutz et al., 1992], pourrait être la conséquence d'une surexpression plutôt que d'une incapacité à intégrer la lamina. La découverte que l'isoprénylation n'est pas nécessaire à l'intégration dans la lamina a été confirmée par une étude de Schmidt et Krohne [1995], dans laquelle la lamine A, *XeLamA(C⁶⁶²→S)-5-IAF*, microinjectée s'intégrait dans la lamina.

Suite à l'accumulation de précurseur par le traitement des cellules à la mévinoline, nous avons approvisionné les cellules en mévalonate pour que le processus de maturation de la protéine soit rétabli. Nous avons observé que le précurseur était transformé en protéine mature directement dans la lamina. Les foyers intranucléaires étaient toujours présents. La machinerie enzymatique nécessaire à ce processus de maturation est donc présente dans le noyau.

Un point de vue différent sur le cheminement des lamines A et C vers la lamina a été soulevé récemment par Pugh et al. [1997]. Dans des expériences de microinjections de lamines A et C fluorescentes dans des cellules Swiss 3T3, ils ont observé le passage par des foyers avec la lamine C. Cependant, les microinjections de lamines A ne leur permettaient pas ou peu d'observer la présence de foyers. Ils ont émis l'hypothèse, tout comme Schmidt et al. [1994], que les foyers observés dans plusieurs cellules correspondraient à des repliements de l'enveloppe nucléaire plutôt qu'à des structures organisées. La différence entre la cellule microinjectée avec la lamine A, qui présente peu ou pas de foyers, et celle microinjectée avec la lamine C, qui contient plusieurs foyers, est cependant très nette sur l'illustration. Par contre, la fluorescence totale observée à la suite de la microinjection avec la lamine A semble beaucoup plus faible que celle obtenue avec la lamine C et ce, malgré le fait que la lamine A soit marquée plus fortement (3.2 mole marqueur/mole) que la lamine C (0.5 mole marqueur/mole). L'incorporation de la lamine C dans la lamina était aussi plus lente que celle de la lamine A (24 h vs 60 min). Lorsqu'ils microinjectaient les deux protéines simultanément, la lamine A colocalisait avec la lamine C dans les foyers et l'incorporation de la lamine C dans la lamina était accélérée. Les auteurs ont suggéré que la lamine A aurait pour rôle de faciliter l'incorporation de la lamine C.

Pour expliquer le fait qu'ils n'aient pas observé le passage par des foyers avec la lamine A fluorescente, alors que les microinjections de lamine A biotinylée de Goldman et al. [1992] en avait permis l'observation, Pugh et al. [1997] présument que la biotinylation des lamines A modifierait la réactivité de la protéine. Cette lamine biotinylée formerait par conséquent des agrégats dans le noyau. Ils omettent aussi de mentionner que nous avons localisé le précurseur endogène de la lamine A dans des foyers intranucléaires. Je crois cependant que ces résultats ne sont pas irréconciliables. L'utilisation de lamine A biotinylée par Goldman et al. [1992] et sa détection par un anticorps antibiotine, suivi d'un second anticorps fluorescent résulte en une

amplification importante du signal. De plus, les lamines biotinylées ont été microinjectées à une concentration de 0.8 mg/ml, soit à une concentration 1.6 fois plus élevée que les lamines fluorescentes injectées à 0.5 mg/ml. Les expériences de Goldman et al. [1992] ont donc permis de visualiser un phénomène possiblement réel, qui passe inaperçu dans une partie des expériences de Schmidt et de Pugh. Par contre, la co-microinjection de lamines A et C démontre le passage par les foyers et son interprétation, voulant que la lamine A ait pour rôle de faciliter l'incorporation de la lamine C, est plausible. Nous ne pouvons malheureusement pas, à ce stade, affirmer que la lamine C est colocalisée en foyers avec le précurseur de la lamine A, ou avec la lamine A mature. Il est aussi possible que la lamine C joue un rôle dans la maturation de la lamine A.

Qu'en est-il du rôle de l'isoprénylation transitoire de la lamine A? Notre étude ne nous a pas permis de faire la différence entre le précurseur isoprénylé et le précurseur non-isoprénylé. Il serait intéressant de produire des Acs qui permettraient de faire la différence entre ces deux molécules. Ces anticorps nous permettraient de vérifier si les foyers sont des sites d'isoprénylation ou de coupure protéolytique. Nous avons toutefois démontré que l'isoprénylation transitoire n'était pas essentielle pour l'intégration de la lamina. Schmidt et Krohne [1995] l'ont confirmé. Est-ce que l'isoprénylation permet à la lamine A d'interagir avec une autre composante nucléaire pour un rôle précis et/ou est-ce que cette isoprénylation a pour but de permettre la transformation du précurseur en protéine mature à un moment précis? Kilic et al. [1997a] ont démontré que le site de coupure était masqué sur la protéine native et que l'isoprénylation pourrait changer la conformation du précurseur de façon à rendre ce site accessible à la protéase.

Qu'en est-il du rôle de ce précurseur de la lamine A? Le principal indice à ce jour vient de transfections effectuées dans des cellules F9 [Sinensky et al., 1994b]. Le précurseur de la lamine A a conféré aux cellules F9, qui ne possèdent pas de lamines de

type A, la sensibilité à la lovastatine (mévinoline). La lovastatine inhibe la synthèse du mévalonate, ce qui se traduit dans les cellules par une inhibition de la synthèse de l'ADN. Les cellules demeurent en phase G1 du cycle cellulaire. Cette sensibilité n'a pas été observée lorsque la lamine A mature était transfectée dans ces cellules. Cette observation a conduit à l'hypothèse que le précurseur de la lamine A pourrait être impliqué dans le blocage de la réplication de l'ADN provoqué par ce traitement. La lamine A se retrouve ainsi, encore une fois, à la croisée d'une voie métabolique en relation avec le processus de la réplication.

3 LA LAMINE A INTERAGIRAIT AVEC UN «MOTEUR» NUCLÉAIRE

L'expression différentielle des lamines suggère qu'elles jouent un rôle dans l'organisation de la structure nucléaire. Étant donné que la lamine A semble avoir plus d'affinité pour la chromatine que la lamine C, nous avons cherché à identifier des éléments impliqués dans l'interaction entre la lamine A et la chromatine. Des extraits cellulaires ont été sondés à l'aide d'une protéine recombinante qui correspond au domaine C-terminal unique de la lamine A mature, fusionné à la GST. Plusieurs protéines ont été entraînées avec cette protéine de fusion mais la bande la plus fortement marquée possédait un PM apparent de ~43 kDa.

Nos travaux précédents avaient permis d'observer l'association de la lamine A avec le nucléosquelette [Hozak et al., 1995]. Zhang et al. [1996a] ont démontré que l'assemblage de la lamina était nécessaire à la formation d'un réseau de filaments interne et à la réplication de l'ADN. Ils ont proposé que ces réseaux de filaments seraient nécessaires pour fournir l'intégrité des tensions à l'intérieur du noyau ainsi que pour soutenir la réplication de l'ADN. D'un autre côté, l'actine forme l'une des principales structures impliquées dans la transmission de signal mécano-chimique. La présence d'actine dans le noyau ayant été fortement documentée au cours des dernières années

(voir introduction), nous avons voulu vérifier si le ligand de 43 kDa correspondait à l'actine. Nous avons effectivement identifié l'actine comme protéine interagissant avec la lamine A.

Ces travaux ne nous ont pas permis de montrer que la lamine A interagirait directement avec l'actine parce que l'interaction que nous avons détectée pourrait impliquer un complexe. L'utilisation de l'actine pour sonder un extrait cellulaire soluble, dans le but de détecter une interaction avec les lamines, ne peut se faire à cause de l'insolubilité des lamines. Ces travaux pourraient être poursuivis par des essais de transfections ou de microinjections *in vivo*, de façon à observer les effets d'une perturbation de cette interaction.

Pendant que nous travaillions à ces travaux, un résumé présenté dans un congrès de l'American Society for Cell Biology (ASCB) a attiré notre attention. Ce résumé était intitulé : "Actin forms a major part of the nuclear matrix in DNA-replication competent sperm pronuclei assembled *in vitro* and is required for DNA replication" [Zhang et al., 1996b]. Ce résumé mentionnait que l'actine entrait dans le noyau après l'assemblage de la lamina mais avant la formation des usines de réplication. En présence de gelsolin S1, la formation des noyaux et la réplication de l'ADN étaient inhibés. À partir de ces résultats, ces auteurs ont suggéré que l'actine serait impliquée dans le maintien de l'organisation de la chromatine, dans la réplication de l'ADN et serait associée au nucléosquelette.

4 CONCLUSIONS

En résumé, nos travaux ont montré que la lamine A est associée aux noeuds et aux protubérances du nucléosquelette. Le précurseur endogène de la lamine A est localisé dans des foyers intranucléaires, et l'intégration de la lamine A dans la lamina est indépendante de l'isoprénylation transitoire de cette protéine. Et finalement, il y aurait

une interaction entre la lamine A et l'actine nucléaire, relation qui pourrait expliquer les «mouvements» impliqués dans l'organisation de la structure de la chromatine, ainsi que le maintien de cette structure dans un état de tension qui empêche l'affaissement.

5 SPÉCULATIONS

La présence de lamine A (précurseur ou mature) en foyers intranucléaires peut avoir différentes fonctions. Ces foyers pourraient représenter des sites d'interactions entre les lamines A et C. Cette association intranucléaire des lamines A/C pourrait permettre la maturation de la lamine A, conduire la lamine C à la lamina périphérique ou être nécessaire à l'interaction des lamines A/C avec une autre composante nucléaire. Ces foyers pourraient aussi être le site d'une interaction entre le précurseur de la lamines A et une composante d'un domaine particulier de la chromatine, de façon à remodeler la chromatine lorsque la lamine A intègre la périphérie nucléaire. Certains foyers pourraient correspondre à des points d'ancrage au nucléosquelette. La liaison nucléosquelette/lamine A/actine illustre le lien structure-mouvement nécessaire à l'établissement d'une structure tridimensionnelle de la chromatine. Ces interactions doivent être régulées de façon à permettre les activités métaboliques se produisant dans le noyau.

Les lamines de type A sont exprimées au cours du développement et de la différenciation. On peut donc supposer que les fonctions des lamines de type A sont effectuées par les lamines de type B dans les cellules qui ne contiennent que ce type de lamines. Ainsi, les principes généraux qui proviennent du modèle de noyaux reconstitués à partir d'extraits d'oocytes de *Xenopus*, qui ne contiennent que des lamines de type B, peuvent être adaptés aux lamines de type A. La découverte par Höger et al [1991] de la capacité du peptide correspondant aux résidus 598-641 de la lamine A de compétitionner la liaison lamine B/chromatine en est un exemple. Les

travaux de Spann [1997] démontrant qu'un mutant de lamine A, délété de son domaine N-terminal, a le même effet sur les noyaux reconstitués de *Xenopus* que dans les cellules de mammifères en est un autre. Il semble que les lamines de type A viennent «raffiner» les fonctions des lamines de type B. Les lamines de type A viendraient s'insérer dans les voies métaboliques dans lesquelles sont impliquées les lamines de type B. Ainsi, les lamines B, qui ne sont pas associées au nucléosquelette, colocalisent avec les usines de réplifications qui, elles, sont associées au nucléosquelette. Les lamines de type A sont associées à ce nucléosquelette et pourraient ainsi, par la modulation de ce dernier, s'impliquer dans la réplication. Ainsi, la relation entre l'état prolifératif des cellules et l'expression des lamines de type A pourrait engendrer une structure plus rigide qui inhiberait la réplication. L'actine serait l'élément contractile permettant les mouvements des structures impliquées dans ces activités. Les interactions entre la lamine A et ses différents partenaires doivent par conséquent être régulées de façon stricte.

Les lamines A et C diffèrent par leur portion C-terminale et les 98 a.a. spécifiques de la lamine A seraient très importants dans l'association avec ses partenaires. Cependant, l'association lamine A/lamine C peut modifier la disponibilité de cette région. Il serait aussi très intéressant de caractériser le rôle de la région acide (551-557) et du groupement polyhistidine (563-566) des lamines A/C. Cette région pourrait influencer les interactions entre les lamines et entre les lamines et les autres protéines. Il est possible que les histidines soient impliquées dans une activité histidine kinase régulatrice, activité qui serait impliquée dans la transmission de signal chez les eucaryotes [Loomis et al., 1997]. Ces histidines pourraient aussi interagir avec des ions et ainsi modifier la conformation du domaine C-terminal de la lamine A. L'importance de cette région est illustrée par la lamine A Δ 10 (i.e. délétée des a.a. 537-566) [Machiels et al., 1996]. Cette lamine A Δ 10 a perdu l'exon 10 qui code pour la région acide et le groupement polyhistidine. Cette protéine est localisée de façon

aberrante en agrégats dans le nucléoplasme dans des cellules cancéreuses. Ainsi, la perturbation des liaisons de la lamine A pourrait être impliquée dans la perte du contrôle de la prolifération cellulaire. Les interactions du domaine C-terminal de la lamine A avec ses partenaires pourraient aussi être régulées par la phosphorylation de la S⁵²⁵. Cette sérine, qui est phosphorylée *in vitro* par la PKC, est localisée juste devant cette région ; elle est donc bien positionnée pour être impliquée dans les interactions de la protéine.

BIBLIOGRAPHIE

- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. et Gerace, L.,** (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560-4.
- Allen, W.E., Jones, G.E., Pollard, J.W. et Ridley, A.J.,** (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal of Cell Science* **110**, 707-20.
- Alzheimer, M. et Benavente, R.,** (1996). Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: Expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Experimental Cell Research* **228**, 181-8.
- Amankwah, K.S. et De Boni, U.,** (1994). Ultrastructural localization of filamentous actin within neuronal interphase nuclei in situ. *Experimental Cell Research* **210**, 315-25.
- Ankarcrona, M., Zhivotovsky, B., Holmstrom, T., Diana, A., Eriksson, J.E., Orrenius, S. et Nicotera, P.,** (1996). Lamin and Beta-Tubulin Fragmentation Precede Chromatin Degradation In Glutamate-Induced Neuronal Apoptosis. *Neuroreport* **7**, 2659-64.
- Appelbaum, J., Blobel, G. et Georgatos, S.D.,** (1990). In vivo phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane receptor is affected by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 4181-4.
- Ausma, J., Vaneyns, G., Broers, J.L.V., Thone, F., Flameng, W., Ramaekers, F.C.S. et Borgers, M.,** (1996). Nuclear lamin expression in chronic hibernating myocardium in man. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* **28**, 1297-305.
- Avila, J.,** (1992). Microtubule functions. [Review]. *Life Sciences* **50**, 327-34.
- Bailer, S.M., Eppenberger, H.M., Griffiths, G. et Nigg, E.A.,** (1991). Characterization of a 54-kD protein of the inner nuclear membrane: evidence for cell cycle-dependent interaction with the nuclear lamina. *Journal of Cell Biology* **114**, 389-400.

- Baricheva, E.A., Berrios, M., Bogachev, S.S., Borisevich, I.V., Lapik, E.R., Sharakhov, I.V., Stuurman, N. et Fisher, P.A.,** (1996). DNA from *Drosophila melanogaster* Beta-heterochromatin binds specifically to nuclear lamins in vitro and the nuclear envelope in situ. *Gene* **171**, 171-6.
- Barton, N.R. et Goldstein, L.S.,** (1996). Going mobile: microtubule motors and chromosome segregation. [Review]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1735-42.
- Beck, L.A., Hosick, T.J. et Sinensky, M.,** (1990). Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *Journal of Cell Biology* **110**, 1489-99.
- Belgrader, P., Siegel, A.J. et Berezney, R.,** (1991). A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *Journal of Cell Science* **98**, 281-91.
- Belmont, A.S., Zhai, Y. et Thilenius, A.,** (1993). Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *Journal of Cell Biology* **123**, 1671-85.
- Benavente, R. et Krohne, G.,** (1986). Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *Journal of Cell Biology* **103**, 1847-54.
- Benavente, R., Krohne, G. et Franke, W.W.,** (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**, 177-90.
- Berezney, R. et Coffey, D.S.,** (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **60**, 1410-7.

- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S. et al.**, (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 & Cellular Biology* **12**, 3499-506.
- Bissell, M.J., Hall, H.G. et Parry, G.**, (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology* **99**, 31-68.
- Blobel, G.**, (1985). Gene gating: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 8527-9.
- Bloom, S., Lockard, V.G. et Bloom, M.**, (1996). Intermediate filament-mediated stretch-induced changes in chromatin: A hypothesis for growth initiation in cardiac myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* **28**, 2123-7.
- Bossie, C.A. et Sanders, M.M.**, (1993). A cDNA from *Drosophila melanogaster* encodes a lamin C-like intermediate filament protein. *Journal of Cell Science* **104**, 1263-72.
- Boudreau, N., Myers, C. et Bissell, M.J.**, (1995). From laminin to lamin - regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends in Cell Biology* **5**, 1-4.
- Bremer, J.W., Busch, H. et Yeoman, L.C.**, (1981). Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscles actins. *Biochemistry* **20**, 2013-7.
- Bridger, J.M., Kill, I.R., O'Farrell, M. et Hutchison, C.J.**, (1993). Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *Journal of Cell Science* **104**, 297-306.
- Broers, J.L., Raymond, Y., Rot, M.K., Kuijpers, H., Wagenaar, S.S. et Ramaekers, F.C.**, (1993). Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *American Journal of Pathology* **143**, 211-20.

- Broers, J.L.V., Machiels, B.M., Kuijpers, H.J.H., Smedts, F., Vandenkieboom, R., Raymond, Y. et Ramaekers, F.C.S.,** (1997). A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochemistry & Cell Biology* **107**, 505-17.
- Burke, B.,** (1990). On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research* **186**, 169-76.
- Burke, B. et Gerace, L.,** (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* **44**, 639-52.
- Cance, W.G., Chaudhary, N., Worman, H.J., Blobel, G. et Cordon-Cardo C.,** (1992). Expression of the nuclear lamins in normal and neoplastic human tissues. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **11**, 233-46.
- Chen, B.M. et Grinnell, A.D.,** (1995). Integrins and modulation of transmitter release from motor nerve terminals by stretch. *Science* **269**, 1578-80.
- Clark, E.A. et Brugge, J.S.,** (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. [Review]. *Science* **268**, 233-9.
- Clarke, S.,** (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. [Review]. *Annual Review of Biochemistry* **61**, 355-86.
- Coates, P.J., Hobbs, R.C., Crocker, J., Rowlands, D.C., Murray, P., Quinlan, R. et Hall, P.A.,** (1996). Identification of the antigen recognized by the monoclonal antibody BU31 as lamins A and C [see comments]. *Journal of Pathology* **178**, 21-9.
- Collard, J.F. et Raymond, Y.,** (1990). Transfection of human lamins A and C into mouse embryonal carcinoma cells possessing only lamin B. *Experimental Cell Research* **186**, 182-7.
- Collard, J.F. et Raymond, Y.,** (1992). Phorbol esters induce transient changes in the accessibility of the carboxy-terminal domain of nuclear lamin A. *Experimental Cell Research* **201**, 174-83.

- Collard, J.F., Senecal, J.L. et Raymond, Y.**, (1990). Differential accessibility of the tail domain of nuclear lamin A in interphase and mitotic cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **173**, 363-9.
- Collard, J.F., Senecal, J.L. et Raymond, Y.**, (1992). Redistribution of nuclear lamin A is an early event associated with differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Journal of Cell Science* **101**, 657-70.
- Collas, P., Courvalin, J.C. et Poccia, D.**, (1996). Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. *Journal of Cell Biology* **135**, 1715-25.
- Courvalin, J.C., Segil, N., Blobel, G. et Worman, H.J.**, (1992). The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 19035-8.
- Csermely, P. et Kahn, C.R.**, (1992). Insulin induces the phosphorylation of DNA-binding nuclear proteins including lamins in 3T3-F442A. *Biochemistry* **31**, 9940-6.
- Dagenais, A., Bibor-Hardy, V., Laliberte, J.F., Royal, A. et Simard, R.**, (1985). Detection in BHK cells of a precursor form for lamin A. *Experimental Cell Research* **161**, 269-76.
- Dessev, G., Iovcheva, C., Tasheva, B. et Goldman, R.**, (1988). Protein kinase activity associated with the nuclear lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 2994-8.
- Dyer, J.A., Kill, I.R., Pugh, G., Quinlan, R.A., Lane, E.B. et Hutchison, C.J.**, (1997). Cell cycle changes in A-type lamin associations detected in human dermal fibroblasts using monoclonal antibodies. *Chromosome Research* **5**, 383-94.

- Eggert, M., Radomski, N., Linder, D., Tripier, D., Traub, P. et Jost, E.,** (1993). Identification of novel phosphorylation sites in murine A-type lamins. *European Journal of Biochemistry* **213**, 659-71.
- Eggert, M., Radomski, N., Tripier, D., Traub, P. et Jost, E.,** (1991). Identification of phosphorylation sites on murine nuclear lamin C by RP-HPLC and microsequencing. *FEBS Letters* **292**, 205-9.
- Ellis, D.J., Jenkins, H., Whitfield, W.G.F. et 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 Science* **110**, 2507-18.
- Eyer, J. et Peterson, A.,** (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* **12**, 389-405.
- Fey, E.G. et Penman, S.,** (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 121-5.
- Farnsworth, C.C., Wolda, S.L., Gelb, M.H. et Glomset, J.A.,** (1989). Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 20422-9.
- Firnbach-Kraft, I. et Stick, R.,** (1993). The role of CaaX-dependent modifications in membrane association of *Xenopus* nuclear lamin B3 during meiosis and the fate of B3 in transfected mitotic cells. *Journal of Cell Biology* **123**, 1661-70.
- Firnbach-Kraft, I. et Stick, R.,** (1995). Analysis of nuclear lamin isoprenylation in *Xenopus* oocytes: isoprenylation of lamin B3 precedes its uptake into the nucleus. *Journal of Cell Biology* **129**, 17-24.

- Fisher, D.Z., Chaudhary, N. et 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 of the United States of America* **83**, 6450-4.
- Foisner, R.,** (1997). Dynamic organisation of intermediate filaments and associated proteins during the cell cycle. [Review]. *Bioessays* **19**, 297-305.
- Foisner, R. et Gerace, L.,** (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**, 1267-79.
- Forgacs, G.,** (1995). On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation. [Review]. *Journal of Cell Science* **108**, 2131-43.
- Frangioni, J.V. et 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 Science* **105**, 481-8.
- Fricke, M., Hollinshead, M., White, N. et 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**, 531-44.
- Fuchs, E.,** (1996). The cytoskeleton and disease - genetic disorders of intermediate filaments [Review]. *Annual Review of Genetics* **30**, 197-231.
- Fuchs, E.,** (1995). Keratins and the skin. [Review]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **11**, 123-53.
- Fuchs, E. et Weber, K.,** (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. [Review]. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 345-82.

- Furukawa, K. et 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. et Hotta, Y.**, (1994). Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Experimental Cell Research* **212**, 426-30.
- Furukawa, K., Pante, N., Aebi, U. et Gerace, L.**, (1995). Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *EMBO Journal* **14**, 1626-36.
- Galcheva-Gargova, Z. et Dessev, G.N.**, (1987). Crosslinking of DNA to nuclear lamina proteins by UV irradiation in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry* **34**, 163-8.
- Gant, T.M. et Wilson, K.L.**, (1997). Nuclear assembly [Review]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **13**, 669-95.
- Georgatos, S.D.**, (1994). Towards an understanding of nuclear morphogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* **55**, 69-76.
- Georgatos, S.D. et Blobel, G.**, (1987a). Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology* **105**, 117-25.
- Georgatos, S.D. et Blobel, G.**, (1987b). Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *Journal of Cell Biology* **105**, 105-15.
- Georgatos, S.D. et Maison, C.**, (1996). Integration of intermediate filaments into cellular organelles. [Review]. *International Review of Cytology* **164**, 91-138.
- Georgatos, S.D., Maroulakou, I. et Blobel, G.**, (1989). Lamin A, lamin B, and lamin B receptor analogues in yeast. *Journal of Cell Biology* **108**, 2069-82.

- Georgatos, S.D., Pyrpasopoulou, A. et Theodoropoulos, P.A.,** (1997). Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-driven deformation of the nuclear membrane. *Journal of Cell Science* **110**, 2129-40.
- Georgatos, S.D., Weber, K., Geisler, N. et Blobel, G.,** (1987). Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes: evidence for a conserved site-specificity in intermediate filament-membrane interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 6780-4.
- Gerace, L. et Blobel, G.,** (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277-87.
- Gerace, L., Blum, A. et 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**, 546-66.
- Gerace, L. et Burke, B.,** (1988). Functional organization of the nuclear envelope. [Review]. *Annual Review of Cell Biology* **4**, 335-74.
- Gerace, L., Comeau, C. et Benson, M.,** (1984). Organization and modulation of nuclear lamina structure. *Journal of Cell Science Supplement* **1**, 137-60.
- Getzenberg, R.H., Pienta, K.J., Huang, E.Y., Murphy, B.C. et Coffey, D.S.,** (1991). Modifications of the intermediate filament and nuclear matrix networks by the extracellular matrix. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **179**, 340-4.
- Glass, C.A., Glass, J.R., Taniura, H., Hasel, K.W., Blevitt, J.M. et Gerace, L.,** (1993). The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO Journal* **12**, 4413-24.
- Glass, J.R. et Gerace, L.,** (1990). Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *Journal of Cell Biology* **111**, 1047-57.

- Goldberg, M., Jenkins, H., Allen, T., Whitfield, W.G. et Hutchison, C.J.**, (1995). Xenopus lamin B3 has a direct role in the assembly of a replication competent nucleus: evidence from cell-free egg extracts. *Journal of Cell Science* **108**, 3451-61.
- Goldberg, M.W. et Allen, T.D.**, (1996). The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *Journal of Molecular Biology* **257**, 848-65.
- Goldberg, M.W., Wiese, C., Allen, T.D. et Wilson, K.L.**, (1997). Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly. *Journal of Cell Science* **110**, 409-20.
- Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M. et Goldman, R.D.**, (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *Journal of Cell Biology* **119**, 725-35.
- Goldman, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P. et Steinert, P.M.**, (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *Journal of Cell Biology* **134**, 971-83.
- Goldstein, L., Ko, C. et Errick, J.**, (1977a). Nuclear actin: an apparent association with condensed chromatin. *Cell Biology International Reports* **1**, 511-5.
- Goldstein, L., Rubin, R. et Ko, C.**, (1977b). The presence of actin in nuclei: a critical appraisal. *Cell* **12**, 601-8.
- Haas, M. et Jost, E.**, (1993). Functional analysis of phosphorylation sites in human lamin A controlling lamin disassembly, nuclear transport and assembly. *European Journal of Cell Biology* **62**, 237-47.
- Hakes, D.J. et Berezney, R.**, (1991). DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. Evidence for salt-resistant DNA binding sites. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 11131-40.

- Hamid, Q.A., Fatima, S., Thanumalayan, S. et Parnaik, V.K.,** (1996). Activation of the lamin A gene during rat liver development. *FEBS Letters* **392**, 137-42.
- Heald, R. et McKeon, F.,** (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* **61**, 579-89.
- Heitlinger, E., Peter, M., Haner, M., Lustig, A., Aebi, U. et 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**, 485-95.
- Heitlinger, E., Peter, M., Lustig, A., Villiger, W., Nigg, E.A. et 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.
- Hennekes, H. et Nigg, E.A.,** (1994). The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *Journal of Cell Science* **107**, 1019-29.
- Hennekes, H., Peter, M., Weber, K. et Nigg, E.A.,** (1993). Phosphorylation on protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B2. *Journal of Cell Biology* **120**, 1293-304.
- Hoger, T.H., Krohne, G. et Franke, W.W.,** (1988). Amino acid sequence and molecular characterization of murine lamin B as deduced from cDNA clones. *European Journal of Cell Biology* **47**, 283-90.
- Hoger, T.H., Krohne, G. et Kleinschmidt, J.A.,** (1991). Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Experimental Cell Research* **197**, 280-9.

- Hoger, T.H., Zatloukal, K., Waizenegger, I. et Krohne, G., (1990).** Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin [published erratum appears in *Chromosoma* 1990 Dec;100(1):67-9]. *Chromosoma* **99**, 379-90.
- Holtz, D., Tanaka, R.A., Hartwig, J. et McKeon, F., (1989).** The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* **59**, 969-77.
- Horton, H., McMorro, I. et Burke, B., (1992).** Independent expression and assembly properties of heterologous lamins A and C in murine embryonal carcinomas. *European Journal of Cell Biology* **57**, 172-83.
- Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. et Cook, P.R., (1993).** Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* **73**, 361-73.
- Hozak, P., Sasseville, A.M., Raymond, Y. et Cook, P.R., (1995).** Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Science* **108**, 635-44.
- Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A. et Ginsberg, M.H., (1997).** Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* **88**, 521-30.
- Ingber, D.E., (1993).** Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. [Review]. *Journal of Cell Science* **104**, 613-27.
- Ingber, D.E., (1997).** Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. [Review]. *Annual Review of Physiology* **59**, 575-99.
- Jackson, D.A. et Cook, P.R., (1988).** Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat. *EMBO Journal* **7**, 3667-77.

- Jenkins, H., Holman, T., Lyon, C., Lane, B., Stick, R. et Hutchison, C.,** (1993). Nuclei that lack a lamina accumulate karyophilic proteins and assemble a nuclear matrix. *Journal of Cell Science* **106**, 275-85.
- Kamat, A.K., Rocchi, M., Smith, D.I. et Miller, O.J.,** (1993). Lamin A/C gene and a related sequence map to human chromosomes 1q12.1-q23 and 10. *Somatic Cell & Molecular Genetics* **19**, 203-8.
- Kaufmann, S.H.,** (1992). Expression of nuclear envelope lamins A and C in human myeloid leukemias. *Cancer Research* **52**, 2847-53.
- Kaufmann, S.H., Mabry, M., Jasti, R. et Shaper, J.H.,** (1991). Differential expression of nuclear envelope lamins A and C in human lung cancer cell lines. *Cancer Research* **51**, 581-6.
- Khanuja, P.S., Lehr, J.E., Soule, H.D., Gehani, S.K., Noto, A.C., Choudhury, S., Chen, R. et Pienta, K.J.,** (1993). Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. *Cancer Research* **53**, 3394-8.
- Kilic, F., Dalton, M.B., Burrell, S.K., Mayer, J.P., Patterson, S.D. et Sinensky, M.,** (1997a). In vitro assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 5298-304.
- Kilic, F., Salasmarco, J., Garland, J. et Sinensky, M.,** (1997b). Regulation of prelamin A endoprotease activity by prelamin A. *FEBS Letters* **414**, 65-68.
- Kill, I.R. et Hutchison, C.J.,** (1995). S-phase phosphorylation of lamin B2. *FEBS Letters* **377**, 26-30.
- Kitten, G.T. et Nigg, E.A.,** (1991). The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *Journal of Cell Biology* **113**, 13-23.

- Kouklis, P.D., Merdes, A., Papamarcaki, T. et Georgatos, S.D.,** (1993). Transient arrest of 3T3 cells in mitosis and inhibition of nuclear lamin reassembly around chromatin induced by anti-vimentin antibodies. *European Journal of Cell Biology* **62**, 224-36.
- Krachmarov, C.P. et Traub, P.,** (1993). Heat-induced morphological and biochemical changes in the nuclear lamina from Ehrlich ascites tumor cells in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry* **52**, 308-19.
- Krohne, G., Waizenegger, I. et 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**, 2003-11.
- Kumar, A., Raziuddin, Finlay, T.H., Thomas, J.O. et Szer, W.,** (1984). Isolation of a minor species of actin from the nuclei of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochemistry* **23**, 6753-7.
- Kunze, D. et Rustow, B.,** (1993). Pathobiochemical aspects of cytoskeleton components. [Review]. *European Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry* **31**, 477-89.
- Laliberte, J.F., Dagenais, A., Filion, M., Bibor-Hardy, V., Simard, R. et Royal, A.,** (1984). Identification of distinct messenger RNAs for nuclear lamin C and a putative precursor of nuclear lamin A. *Journal of Cell Biology* **98**, 980-5.
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J. et Hall, A.,** (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519-29.
- Lange, B.M.H. et Gull, K.,** (1996). Structure and function of the centriole in animal cells: progress and questions. *Trends in cell biology* **6**, 348-52.

- Lanoix, J., Skup, D., Collard, J.F. et Raymond, Y.,** (1992). Regulation of the expression of lamins A and C is post-transcriptional in P19 embryonal carcinoma cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **189**, 1639-44.
- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. et Earnshaw, W.C.,** (1995). Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9042-6.
- Lebel, S., Lampron, C., Royal, A. et Raymond, Y.,** (1987). Lamins A and C appear during retinoic acid-induced differentiation of mouse embryonal carcinoma cells. *Journal of Cell Biology* **105**, 1099-104.
- Lebel, S. et Raymond, Y.,** (1987). Lamins A, B and C share an epitope with the common domain of intermediate filament proteins. *Experimental Cell Research* **169**, 560-5.
- Lehner, C.F., Stick, R., Eppenberger, H.M. et Nigg, E.A.,** (1987). Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *Journal of Cell Biology* **105**, 577-87.
- Lenzbohme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. et Schmitt, B.,** (1997). Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm(0) gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *Journal of Cell Biology* **137**, 1001-16.
- Lestourgeon, W.M., Forer, A., Yang, Y.Z., Bertram, J.S. et Pusch, H.P.,** (1975). Contractile proteins. Major components of nuclear and chromosome non-histone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **379**, 529-52.

- Leukel, M. et Jost, E.**, (1995). Two conserved serines in the nuclear localization signal flanking region are involved in the nuclear targeting of human lamin A. *European Journal of Cell Biology* **68**, 133-42.
- Li, H. et Roux, S.J.**, (1992). Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8434-8.
- Lin, F. et Worman, H.J.**, (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 16321-6.
- Lockard, V.G. et Bloom, S.**, (1993). Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* **25**, 303-9.
- Loewinger, L. et McKeon, F.**, (1988). Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO Journal* **7**, 2301-9.
- Loomis, W.F., Shaulsky, G. et Wang, N.**, (1997). Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. [Review]. *Journal of Cell Science* **110**, 1141-5.
- Lourim, D., Kempf, A. et Krohne, G.**, (1996). Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs - increase of lamin L(I) protein synthesis during meiotic maturation. *Journal of Cell Science* **109**, 1775-85.
- Lourim, D. et Krohne, G.**, (1993). Membrane-associated lamins in *Xenopus* egg extracts: identification of two vesicle populations. *Journal of Cell Biology* **123**, 501-12.
- Lourim, D. et Lin, J.J.**, (1992). Expression of wild-type and nuclear localization-deficient human lamin A in chick myogenic cells. *Journal of Cell Science* **103**, 863-74.

- Luderus, M.E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L. et van Driel, R., (1992).** Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* **70**, 949-59.
- Luderus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A. et van Driel, R., (1994).** Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Molecular & Cellular Biology* **14**, 6297-305.
- Lutz, R.J., Trujillo, M.A., Denham, K.S., Wenger, L. et Sinensky, M., (1992).** Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Jun 15;89(12):5699]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3000-4.
- Maccioni, R.B. et Cambiazo, V., (1995).** Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. [Review]. *Physiological Reviews* **75**, 835-64.
- Machiels, B.M., Broers, J.L., Raymond, Y., de Ley, L., Kuijpers, H.J., Caberg, N.E. et Ramaekers, F.C., (1995).** Abnormal A-type lamin organization in a human lung carcinoma cell line. *European Journal of Cell Biology* **67**, 328-35.
- Machiels, B.M., Zorenc, A.H., Endert, J.M., Kuijpers, H.J., van Eys, G.J., Ramaekers, F.C. et Broers, J.L., (1996).** An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 9249-53.
- Maison, C., Pyrpasopoulou, A. et Georgatos, S.D., (1995).** Vimentin-associated mitotic vesicles interact with chromosomes in a lamin B- and phosphorylation-dependent manner. *EMBO Journal* **14**, 3311-24.

- Mancini, M.A., Shan, B., Nickerson, J.A., Penman, S. et Lee, W.H.,** (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 418-22.
- Maniotis, A.J., Chen, C.S. et Ingber, D.E.,** (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 849-54.
- Marshall, I.C.B. et Wilson, K.L.,** (1997). Nuclear envelope assembly after mitosis. *Trends in Cell Biology* **7**, 69-74.
- Martell, R.E., Strahler, J.R. et Simpson, R.U.,** (1992). Identification of lamin B and histones as 1,25-dihydroxyvitamin D₃-regulated nuclear phosphoproteins in HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 7511-9.
- Martin, L., Crimando, C. et Gerace, L.,** (1995). cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 8822-8.
- Mattia, E., Hoff, W.D., den Blaauwen, J., Meijne, A.M., Stuurman, N. et van Renswoude, J.,** (1992). Induction of nuclear lamins A/C during in vitro-induced differentiation of F9 and P19 embryonal carcinoma cells. *Experimental Cell Research* **203**, 449-55.
- McKeon, F.D., Kirschner, M.W. et Caput, D.,** (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* **319**, 463-8.
- McNulty, A.K. et Saunders, M.J.,** (1992). Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *Journal of Cell Science* **103**, 407-14.

- Meier, J., Campbell, K.H., Ford, C.C., Stick, R. et 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 Science* **98**, 271-9.
- Meier, J. et Georgatos, S.D.,** (1994). Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis - Implications For Nuclear Reassembly. *EMBO Journal* **13**, 1888-98.
- Milankov, K. et De Boni, U.,** (1993). Cytochemical localization of actin and myosin aggregates in interphase nuclei in situ. *Experimental Cell Research* **209**, 189-99.
- Minguez, A. et Moreno Diaz de la Espina, S.,** (1993). Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *Journal of Cell Science* **106**, 431-9.
- Moir, R.D., Donaldson, A.D. et 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 Science* **99**, 363-72.
- Moir, R.D., Montag-Lowy, M. et Goldman, R.D.,** (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *Journal of Cell Biology* **125**, 1201-12.
- Moir, R.D., Quinlan, R.A. et Stewart, M.,** (1990). Expression and characterization of human lamin C. *FEBS Letters* **268**, 301-5.
- Mullins, R.D., Kelleher, J.F. et Pollard, T.D.,** (1996). Actin' like actin? *Trends in Cell Biology* **6**, 208-212.
- Nakajima, N. et Abe, K.,** (1995). Genomic structure of the mouse A-type lamin gene locus encoding somatic and germ cell-specific lamins. *FEBS Letters* **365**, 108-14.

- Neamati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J. et McConkey, D.J.,** (1995). Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *Journal of Immunology* **154**, 3788-95.
- Neves, D., Magalhaes, M.M. et Magalhaes, M.C.,** (1993). Adrenal nuclear matrix isolation. A morphologic and biochemical study. *Biology of the Cell* **79**, 139-45.
- Newport, J.W., Wilson, K.L. et Dunphy, W.G.,** (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Biology* **111**, 2247-59.
- Nigg, E.A.,** (1992). Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. [Review]. *Seminars in Cell Biology* **3**, 245-53.
- Nigg, E.A., Kitten, G.T. et Vorburger, K.,** (1992). Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. [Review]. *Biochemical Society Transactions* **20**, 500-4.
- Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S.D. et Giannakouros, T.,** (1997). Mitotic Phosphorylation Of the Lamin B Receptor By a Serine/Arginine Kinase and P34(Cdc2). *Journal of Biological Chemistry* **272**, 6208-13.
- Nowak, G., Pesticdragovich, L., Hozak, P., Philimonenko, A., Simerly, C., Schatten, G. et Delanerolle, P.,** (1997). Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 17176-81.
- Ohnishi, T., Kawamura, H. et Yamamoto, T.,** (1963). *J. Biochem.* **54**, 298-300.
- Okabe, S., Miyasaka, H. et Hirokawa, N.,** (1993). Dynamics of the neuronal intermediate filaments. *Journal of Cell Biology* **121**, 375-86.

- Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y. et 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**, 2649-53.
- Ozaki, T. et Sakiyama, S.**, (1992). Lamin A gene expression is specifically suppressed in v-src-transformed cells. *FEBS Letters* **312**, 165-8.
- Paddy, M.R., Belmont, A.S., Saumweber, H., Agard, D.A. et Sedat, J.W.**, (1990). Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* **62**, 89-106.
- Pante, N. et Aebi, U.**, (1995a). Exploring nuclear pore complex structure and function in molecular detail. [Review]. *Journal of Cell Science Supplement* **19**, 1-11.
- Pante, N. et Aebi, U.**, (1995b). Toward a molecular understanding of the structure and function of the nuclear pore complex. [Review]. *International Review of Cytology* 225-55.
- Parfenov, V.N., Davis, D.S., Pochukalina, G.N., Sample, C.E., Bugaeva, E.A. et Murti, K.G.**, (1995). Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. *Experimental Cell Research* **217**, 385-394.
- Paulin-Levasseur, M. et Julien, M.**, (1992). Expression of intermediate filament proteins in TPA-induced MPC-11 and HL-60 cells. *Experimental Cell Research* **199**, 363-72.
- Paulin-Levasseur, M., Scherbarth, A., Traub, U. et Traub, P.**, (1988). Lack of lamins A and C in mammalian hemopoietic cell lines devoid of intermediate filament proteins. *European Journal of Cell Biology* **47**, 121-31.
- Penman, S.**, (1995). Rethinking cell structure. [Review]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5251-7.

- Peter, M., Heitlinger, E., Haner, M., Aebi, U. et Nigg, E.A.,** (1991). Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO Journal* **10**, 1535-44.
- Peter, M., Kitten, G.T., Lehner, C.F., Vorburger, K., Bailer, S.M., Maridor, G. et Nigg, E.A.,** (1989). Cloning and sequencing of cDNA clones encoding chicken lamins A and B1 and comparison of the primary structures of vertebrate A- and B-type lamins. *Journal of Molecular Biology* **208**, 393-404.
- Peter, M. et Nigg, E.A.,** (1991). Ectopic expression of an A-type lamin does not interfere with differentiation of lamin A-negative embryonal carcinoma cells. *Journal of Cell Science* **100**, 589-98.
- Pienta, K.J. et Hoover, C.N.,** (1994). Coupling of cell structure to cell metabolism and function. *Journal of Cellular Biochemistry* **55**, 16-21.
- Pugh, G.E., Coates, P.J., Lane, E.B., Raymond, Y. et Quinlan, R.A.,** (1997). Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in Swiss 3T3 cells. *Journal of Cell Science* **110**, 2483-93.
- Pyrpasopoulou, A., Meier, J., Maison, C., Simos, G. et Georgatos, S.D.,** (1996). The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *Embo* **15**, 7108-19.
- Rao, L., Modha, D. et White, E.,** (1997). The E1B 19K protein associates with lamins in vivo and its proper localization is required for inhibition of apoptosis. *Oncogene* **15**, 1587-97.
- Rao, L., Perez, D. et White, E.,** (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *Journal of Cell Biology* **135**, 1441-45.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. et Aebi, U.,** (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *Journal of Cell Biology* **110**, 883-94.

- Riemer, D., Dodemont, H. et Weber, K.,** (1993). A nuclear lamin of the nematode *Caenorhabditis elegans* with unusual structural features; cDNA cloning and gene organization. *European Journal of Cell Biology* **62**, 214-23.
- Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P.A. et Weber, K.,** (1995). Expression of *Drosophila* lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. *Journal of Cell Science* **108**, 3189-98.
- Rius, C., Vilaboa, N., Mata, F. et Aller, P.,** (1993). Differential modulation of the expression of the intermediate filament proteins vimentin and nuclear lamins A and C by differentiation inducers in human myeloid leukemia (U-937, HL-60) cells. *Experimental Cell Research* **208**, 115-20.
- Rober, R.A., Sauter, H., Weber, K. et Osborn, M.,** (1990). Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *Journal of Cell Science* **95**, 587-98.
- Rober, R.A., Weber, K. et 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**, 365-78.
- Roskelley, C.D., Desprez, P.Y. et Bissell, M.J.,** (1994). Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12378-82.
- Rout, M.P. et Blobel, G.,** (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology* **123**, 771-83.
- Rungger-Brandle, E., Chaponnier, C. et Gabbiani, G.,** (1979). Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation. *Nature* **282**, 320-1.

- Rzepecki, R., Bogachev, S.S., Kokoza, E., Stuurman, N. et Fisher, P.A.,** (1998). In vivo association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science* **111**, 121-9.
- Sahlas, D.J., Milankov, K., Park, P.C. et De Boni, U.,** (1993). Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *Journal of Cell Science* **105**, 347-57.
- Sauman, I. et Berry, S.J.,** (1994). An actin infrastructure is associated with eukaryotic chromosomes - structural and functional significance. *European Journal of Cell Biology* **64**, 348-56.
- Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W.W. et Jockusch, B.M.,** (1984). Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* **39**, 111-22.
- Scheer, U. et Weisenberger, D.,** (1994). The nucleolus. [Review]. *Current Opinion in Cell Biology* **6**, 354-9.
- Schmidhauser, C., Casperson, G.F., Myers, C.A., Sanzo, K.T., Bolten, S. et Bissell, M.J.,** (1992). A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin- and extracellular matrix-dependent regulation of beta-casein gene expression. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 699-709.
- Schmidt, M., Grossmann, U. et Krohne, G.,** (1995). The nuclear membrane-associated honeycomb structure of the unicellular organism *Amoeba proteus*: on the search for homologies with the nuclear lamina of metazoa. *European Journal of Cell Biology* **67**, 199-208.
- Schmidt, M. et Krohne, G.,** (1995). In vivo assembly kinetics of fluorescently labeled *Xenopus* lamin A mutants. *European Journal of Cell Biology* **68**, 345-54.

- Schmidt, M., Tschodrich-Rotter, M., Peters, R. et Krohne, G.,** (1994). Properties of fluorescently labeled *Xenopus* lamin A in vivo. *European Journal of Cell Biology* **65**, 70-81.
- Schwartz, M.A. et Ingber, D.E.,** (1994). Integrating with integrins. [Review]. *Molecular Biology of the Cell* **5**, 389-93.
- Senior, A. et Gerace, L.,** (1988). Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *Journal of Cell Biology* **107**, 2029-36.
- Sevaljevic, L. et Sekularac, S.,** (1993). The 70 kD rat liver nucleoplasmic protein binding hormone responsive element of rat haptoglobin gene shares size, charge and epitopes with lamin A. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **195**, 13-8.
- Shan, B., Zhu, X., Chen, P.L., Durfee, T., Yang, Y., Sharp, D. et Lee, W.H.,** (1992). Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Molecular & Cellular Biology* **12**, 5620-31.
- Shimanuki, M., Goebel, M., Yanagida, M. et Toda, T.,** (1992). Fission yeast *sts1+* gene encodes a protein similar to the chicken lamin B receptor and is implicated in pleiotropic drug-sensitivity, divalent cation-sensitivity, and osmoregulation. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 263-73.
- Shoeman, R.L. et Traub, P.,** (1993). Assembly of intermediate filaments. *BioEssays* **15**, 605-11.
- Sinensky, M., Fantle, K., Trujillo, M., McLain, T., Kupfer, A. et Dalton, M.,** (1994a). The processing pathway of prelamin A. *Journal of Cell Science* **107**, 61-7.

- Sinensky, M., McLain, T. et Fantle, K.**, (1994b). Expression of prelamin A but not mature lamin A confers sensitivity of DNA biosynthesis to lovastatin on F9 teratocarcinoma cells. *Journal of Cell Science* **107**, 2215-8.
- Smith, A. et Benavente, R.**, (1992). Identification of a short nuclear lamin protein selectively expressed during meiotic stages of rat spermatogenesis. *Differentiation* **52**, 55-60.
- Smith, S. et Blobel, G.**, (1994). Colocalization of vertebrate lamin B and lamin B receptor (LBR) in nuclear envelopes and in LBR-induced membrane stacks of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10124-8.
- Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R. et Goldman, R.D.**, (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *Journal of Cell Biology* **136**, 1201-12.
- Spector, D.L.**, (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. [Review]. *Annual Review of Cell Biology* **9**, 265-315.
- Spector, D.L.**, (1996). Nuclear organization and gene expression. [Review]. *Experimental Cell Research* **229**, 189-97.
- Stewart, C. et Burke, B.**, (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* **51**, 383-92.
- Stick, R.**, (1988). cDNA cloning of the developmentally regulated lamin LIII of *Xenopus laevis*. *EMBO Journal* **7**, 3189-97.
- Stick, R.**, (1992). The gene structure of *Xenopus* nuclear lamin A: a model for the evolution of A-type from B-type lamins by exon shuffling. *Chromosoma* **101**, 566-74.
- Stick, R.** (1995). Nuclear lamins and the nucleoskeleton. In *The cytoskeleton, structure and assembly*: JAI Press Inc, 257-96.

- Streuli, C.H., Bailey, N. et Bissell, M.J.**, (1991). Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *Journal of Cell Biology* **115**, 1383-95.
- Strouboulis, J. et Wolffe, A.P.**, (1996). Functional compartmentalization of the nucleus. [Review] . *Journal of Cell Science* **109**, 1991-2000.
- Stuurman, N.**, (1997). Identification of a conserved phosphorylation site modulating nuclear lamin polymerization. *FEBS Letters* **401**, 171-4.
- Stuurman, N., Sasse, B. et 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.
- Taniura, H., Glass, C. et 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.
- Tsanaclis, A.M., Brem, S.S., Gately, S., Schipper, H.M. et Wang, E.**, (1991). Statin immunolocalization in human brain tumors. Detection of noncycling cells using a novel marker of cell quiescence. *Cancer* **68**, 786-92.
- Ulitzur, N., Harel, A., Feinstein, N. et Gruenbaum, Y.**, (1992). Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. *Journal of Cell Biology* **119**, 17-25.
- Vikstrom, K.L., Lim, S.S., Goldman, R.D. et Borisy, G.G.**, (1992). Steady state dynamics of intermediate filament networks. *Journal of Cell Biology* **118**, 121-9.
- Vorburger, K., Lehner, C.F., Kitten, G.T., Eppenberger, H.M. et Nigg, E.A.**, (1989). A second higher vertebrate B-type lamin. cDNA sequence determination and in vitro processing of chicken lamin B2. *Journal of Molecular Biology* **208**, 405-15.

- Wang, E.**, (1985). A 57,000-mol-wt protein uniquely present in nonproliferating cells and senescent human fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **100**, 545-51.
- Wang, E.**, (1989). Statin, a nonproliferation-specific protein, is associated with the nuclear envelope and is heterogeneously distributed in cells leaving quiescent state. *Journal of Cellular Physiology* **140**, 418-26.
- Ward, G.E. et Kirschner, M.W.**, (1990). Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* **61**, 561-77.
- Weaver, V.M., Carson, C.E., Walker, P.R., Chaly, N., Lach, B., Raymond, Y., Brown, D.L. et Sikorska, M.**, (1996). Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes. *Journal of Cell Science* **109**, 45-56.
- Weber, K., Plessmann, U. et Traub, P.**, (1989). Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Letters* **257**, 411-4.
- Weber, K., Plessmann, U. et Traub, P.**, (1990). Protein chemical analysis of purified murine lamin B identifies two distinct polypeptides B1 and B2. *FEBS Letters* **261**, 361-4.
- Wiley, L.M., Kidder, G.M. et Watson, A.J.**, (1990). Cell polarity and development of the first epithelium. *BioEssays* **12**, 67-73.
- Worman, H.J., Evans, C.D. et Blobel, G.**, (1990). The lamin B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *Journal of Cell Biology* **111**, 1535-42.
- Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G. et Georgatos, S.D.**, (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 8531-4.

- Wydner, K.L., McNeil, J.A., Lin, F., Worman, H.J. et Lawrence, J.B.**, (1996). Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **32**, 474-8.
- Yang, L., Guan, T.L. et Gerace, L.**, (1997a). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *Journal of Cell Biology* **137**, 1199-210.
- Yang, L., Guan, T.L. et Gerace, L.**, (1997b). Lamin-binding fragment of LAP2 inhibits increase in nuclear volume during the cell cycle and progression into S phase. *Journal of Cell Biology* **139**, 1077-87.
- Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q.C., Kouklis, P., Cleveland, D.W. et Fuchs, E.**, (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* **86**, 655-65.
- Ye, Q., Callebaut, I., Pezhman, A., Courvalin, J.C. et Worman, H.J.**, (1997). Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 14983-9.
- Ye, Q. et Worman, H.J.**, (1996). Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14653-6.
- Yuan, J., Simos, G., Blobel, G. et Georgatos, S.D.**, (1991). Binding of lamin A to polynucleosomes. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 9211-5.
- Zewe, M., Hoger, T.H., Fink, T., Lichter, P., Krohne, G. et Franke, W.W.**, (1991). Gene structure and chromosomal localization of the murine lamin B2 gene. *European Journal of Cell Biology* **56**, 342-50.

Zhang, C., Jenkins, H., Goldberg, M.W., Allen, T.D. et Hutchison, C.J., (1996a). Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract. *Journal of Cell Science* **109**, 2275-86.

Zhang, C., Way, M. et Hutchison, C.J., (1996b). Actin forms a major part of the nuclear matrix in DNA-replication competent sperm pronuclei assembled in vitro and is required for DNA replication. Annual Meeting of the 6th International Congress on Cell Biology and the 36th American Society for Cell Biology, San Francisco, California, USA, December 7. *Molecular Biology of the Cell*, Supplement, **7**, 2769.

Zhao, K., Harel, A., Stuurman, N., Guedalia, D. et Gruenbaum, Y., (1996). Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state. *FEBS Letters* **380**, 161-4.

ANNEXE I

1 SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS MONOCLONAL 133A2

Lors des travaux de caractérisation de l'anticorps 133A2, ce dernier a été utilisé pour sonder des extraits totaux de cellules HEP-2 dont les protéines avaient été séparées sur gel SDS-PAGE en deux dimensions et transférées sur nitrocellulose. Le buvardage immunologique présenté à la fig. 1 montre que cet anticorps ne reconnaît que les différentes isoformes de la lamine A.

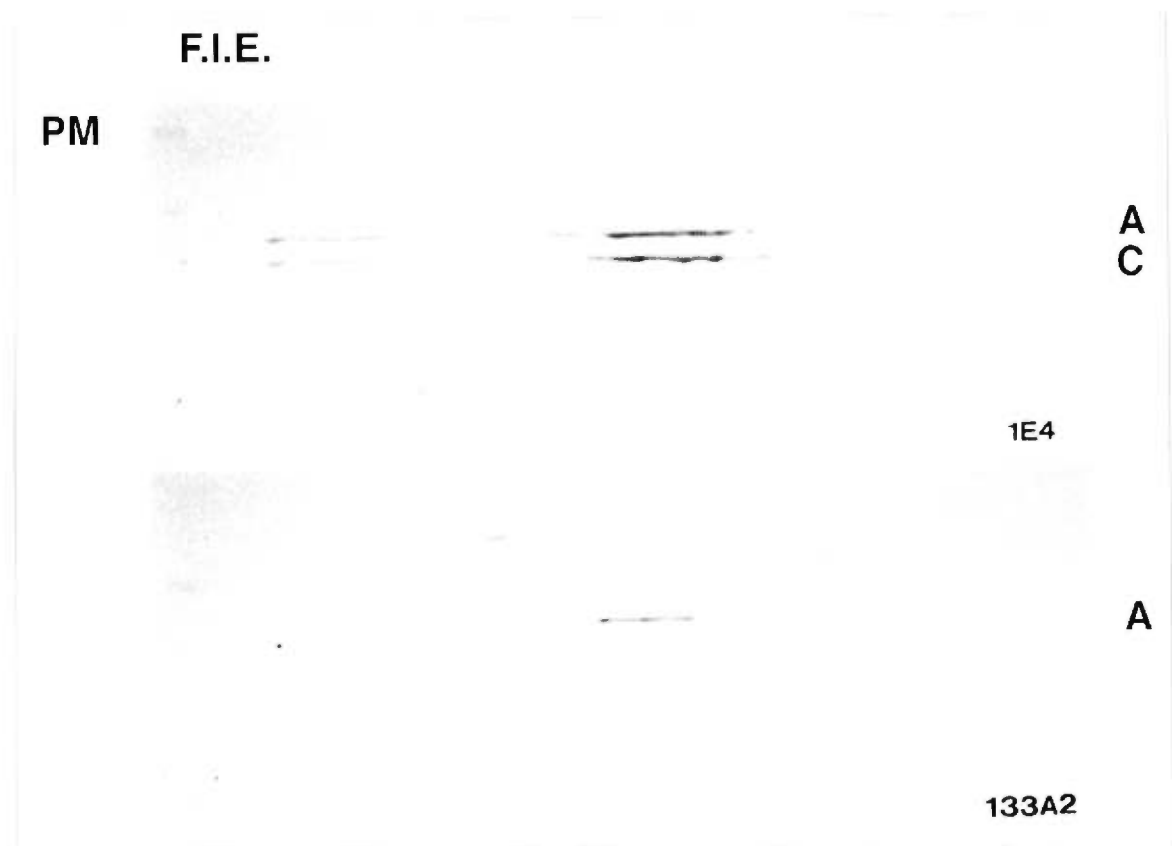


Figure 1 L'Acm 133A2 est spécifique pour la lamine A.

Les protéines provenant de 1×10^6 cellules HEP-2 ont été séparées sur gel SDS-PAGE en 2 dimensions (F.I.E. et PM) puis transférées sur nitrocellulose. Les protéines ont été détectées par l'Acm 1E4 (lamines A et C) ou 133A2 (lamine A).

ANNEXE II

1 ESSAIS DE LIAISON DU DOMAINE C-TERMINAL DE LA LAMINE A SUR MEMBRANE

Un des objectifs poursuivis pendant mes travaux était d'identifier les protéines cellulaires interagissant avec la lamine A. Les lamines étant des protéines insolubles, il était difficile de mettre au point un essai de liaison *in vitro* en utilisant la protéine pleine longueur. J'ai construit des mutants de délétions correspondant au C-terminus de la lamine A (précurseur : lamAN Δ 562 ou mature : lamAN Δ 562C Δ 18). Ces protéines recombinantes ont été utilisées dans des essais préliminaires de liaison sur membrane. La liaison du domaine C-terminal de la lamine A aux protéines cellulaires transférées sur nitrocellulose a été détectée à l'aide d'un anticorps spécifique à ce domaine de la protéine. Les résultats présentés à la fig. 1 montrent que le domaine C-terminal de la lamine A interagit avec plusieurs protéines de PM variant de 20 à 200 kDa (une bande migrant à la même position que le marqueur de 43 kDa est visible).

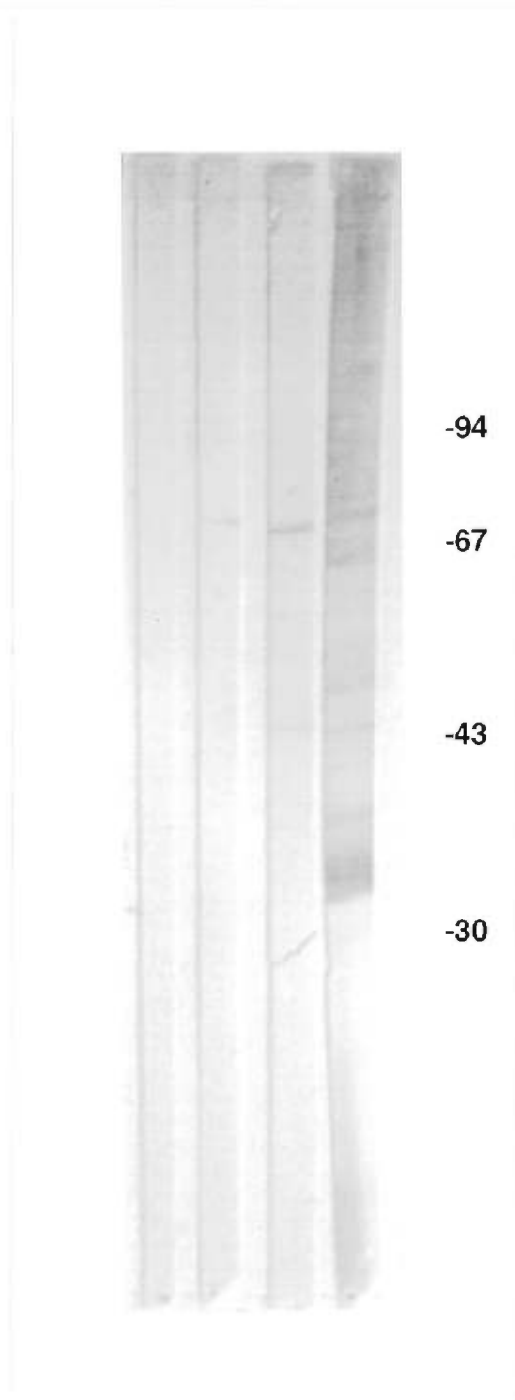


Figure 1 Essai de liaison sur membrane

Les protéines obtenues de lysats totaux de cellules HEP-2 ont été séparées sur gels SDS-PAGE (PM) et transférées sur nitrocellulose. Les nitrocelluloses ont été incubées avec du tampon (bandes 1-2) ou les protéines recombinantes lamAN Δ 562 (bande 3) ou lamAN Δ 562CA18 (bande 4). Ensuite, les interactions ont été détectées avec l'Acm 133A2 spécifique à la lamine A (bandes 2-3-4) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la biotine et de streptavidine couplée à la peroxydase (bandes 1 à 4). La réaction a été visualisée à l'aide de chloronaphtol.