



Università degli Studi di Pisa

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Molecolari e Industriali

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Studio del trasporto nucleocitoplasmatico in una condizione di
assemblaggio difettivo della Lamina Nucleare**

Candidato:
Gianmarco Ferri

Relatore:
Dott. Ranieri Bizzarri

Anno Accademico 2012–2013

Abstract

La Lamina Nucleare (LN) è una struttura proteica filamentosa situata sul versante nucleoplasmatico della membrana nucleare interna, che fornisce una "intelaiatura" per il nucleo della cellula, àncora i Complessi del Poro Nucleare (NPC) e concorre nell'organizzazione dell'eterocromatina periferica. Le mutazioni a carico dei geni delle lamìne (le proteine che costituiscono la Lamina) provocano una serie di malattie che prendono il nome di "laminopatie". Tra di esse, la Sindrome di Hutchinson-Gilford (HGPS), nota anche come Progeria, è una grave patologia che causa invecchiamento precoce nei bambini. Nella maggior parte dei casi, l'HGPS deriva da una sostituzione *de novo* C1824T nel gene della lamina A nucleare (*LMNA*) che attiva un sito donatore di splicing criptico. L'evento di splicing promosso dalla mutazione provoca una delezione interna di 50 amminoacidi che impedisce il normale processamento della proteina LaA (chiamata, nella sua forma mutante, progerina). Nei nuclei di cellule affette da HGPS appaiono frequentemente erniazioni e vesciche a livello dell'Involucro Nucleare e un ispessimento della LN. Se il difetto genetico e proteico alla base della malattia è stato ampiamente compreso, non è noto, invece, l'effetto che l'accumulo di progerina possa avere sulle proprietà intrinseche del trasporto nucleocitoplasmatico attivo e passivo attraverso gli NPC. Tramite l'impiego della tecnica FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*), è stato valutato se il processo di import nucleare risulta alterato in caso di HGPS, considerando la connessione evidente tra NL e NPC. In particolare, i risultati della FRAP sono interpretati tramite un consolidato modello matematico costruito per lo studio della traslocazione nucleoplasmatica sia attiva che passiva. Gli esperimenti sono stati effettuati su cellule in coltura di tipo U2OS, cotrasfettate transientemente al fine di far esprimere loro la progerina e 1) una proteina di fusione di tipo NLS-EGFP, avente funzione di cargo da importare attivamente nel nucleo e 2) EGFP per lo studio del solo trasporto passivo.

Sorprendentemente, i risultati dello studio FRAP hanno dimostrato che non sussiste alcuna alterazione della cinetica del trasporto nucleocitoplasmatico attivo e passivo, suggerendo che l'assemblamento scorretto della Lamina Nucleare nell'HGPS non influenza il trasporto attraverso gli NPC.

Questo lavoro di tesi è stato svolto presso il laboratorio NEST della Scuola Normale Superiore - Istituto Nanoscienze del CNR e presso l'Istituto di Biofisica del CNR.

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Le lamine formano la Lamina Nucleare	2
1.1.1	Il ruolo della Lamina Nucleare nella vita della cellula	7
1.1.2	Le laminopatie	9
1.1.2.1	La sindrome di Hutchinson-Gilford o sindrome progerinica	11
1.1.2.2	Come fa la mutazione nel gene LMNA a causare la malattia?	14
1.2	Il trasporto nucleocitoplasmatico	16
1.2.1	Complessi del Poro Nucleare	16
1.2.2	Il processo di import nucleare	18
1.2.2.1	Il modello di trasporto dipendente da Ran	20
1.2.3	Laminopatie e NPC. Evidenze sperimentali di alterazioni presenti in letteratura	23
1.3	Tecniche biofisiche applicate a domande biologiche	26
1.3.1	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP) accoppiata a sonde fluorescenti codificabili geneticamente	27
1.4	Scopo di questo lavoro di tesi	32

2	Materiali e Metodi	34
2.1	Vettori plasmidici	34
2.2	Colture cellulari e trasfezioni	35
2.3	Microscopia a fluorescenza ed analisi delle immagini	36
2.4	Esperimenti FRAP sulla traslocazione citoplasma/nucleo	38
2.5	Determinazione dei parametri di trasporto	39
3	Risultati e discussioni	41
3.1	Modello dinamico per la traslocazione nucleocitoplasmatica	41
3.1.1	La diffusione passiva	42
3.1.2	Il trasporto attivo	43
3.1.3	Modello completo per la diffusione di molecole fluorescenti	44
3.1.4	Applicazione del modello per NLS-EGFP	45
3.2	Caratterizzazione dei costrutti trasfettati	47
3.3	Determinazione della concentrazione intracellulare di NLS-EGFP tramite calibrazione con Fluoresceina-Glicina	50
3.4	Analisi FRAP della cinetica di import nucleare in cellule esperimenti progerina e in cellule di controllo	52
3.4.1	La trasfezione del costrutto DsRed-LaA non altera i parametri di trasporto	52
3.4.2	Diffusione passiva e trasporto attivo: confronto tra il modello cellulare per la Progeria e le cellule di controllo DsRed-LaA	57
3.5	Conclusioni	58
A	Dati sperimentali	61

Elenco delle figure

1.1	Assemblaggio Lamina Nucleare	2
1.2	Strutture schematiche di filamenti intermedi nucleari e citoplasmatici	5
1.3	Maturazione della prelamina A	7
1.4	Fenotipi tessuto specifici causati da mutazioni del gene <i>LMNA</i>	10
1.5	Maturazione incompleta della progerina	13
1.6	Struttura NPC	17
1.7	Struttura del complesso importina- α , importina- β e proteina cargo	20
1.8	Modello a gradiente di Ran per il trasporto nucleocitoplasmatico	21
1.9	Schema import nucleare	23
1.10	Modello di interazione LN e NPC	24
1.11	Curva di recupero FRAP	28
1.12	Diagramma di Jablonski	30
1.13	Cromoforo della GFP	31
2.1	Microscopio confocale Leica SP2	38
3.1	Diffusione passiva	42
3.2	Trasporto attivo	43
3.3	Caratterizzazione del costrutto DsRed-LaA e DsRed-HGPS	48

3.4	Localizzazione di EFGP e NLS-EGFP	49
3.5	Espressione di DsRed-LaA/NLS-EGFP e DsRed-HGPS/NLS-EGFP	50
3.6	Spettri di assorbimento EGFP e F-Gly	51
3.7	FRAP: recupero della fluorescenza a livello nucleare	53
3.8	Curva sperimentale di recupero della fluorescenza	54
3.9	Box-plot P_{NLS} e $\Phi_{C \rightarrow N}$	55
3.10	Grafico P_{NLS} versus NLS-EGFP	56
3.11	Grafico $\Phi_{C \rightarrow N}$ versus NLS-EGFP	59
A.1	Confronto P_{NLS}	66
A.2	Confronto $\Phi_{C \rightarrow N}$	67

Elenco delle tabelle

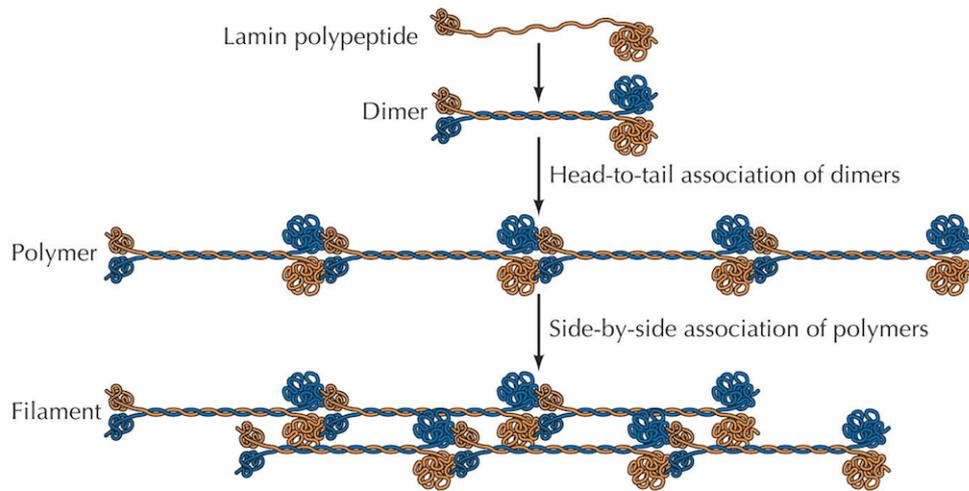
1.1	Lamine presenti nelle cellule umane e loro localizzazione	4
2.1	Disegno sperimentale	37
A.1	Tabella riassuntiva dei dati sperimentali costruito DsRed-LaA	63
A.2	Tabella riassuntiva dei dati sperimentali costruito DsRed-HGPS	64
A.3	Tabella riassuntiva dei dati sperimentali costruito NLS-EGFP (singola trasfezione)	65

CAPITOLO 1

Introduzione

All'interno della cellula la "comunicazione" è importante. La compartimentazione, caratteristica accentuata nelle cellule eucariotiche, fa sì che siano necessari dei complessi macromolecolari situati all'interfaccia tra i vari compartimenti e il citoplasma aventi lo scopo di assicurare un modulabile scambio di molecole. Di seguito saranno dettagliati da un punto di vista strutturale e funzionale i complessi proteici aventi ruoli di primo piano nello scambio di macromolecole tra citoplasma e nucleo, compartimento, quest'ultimo, forse più importante tra quelli presenti in una cellula eucariote, custode del patrimonio genetico.

La barriera principale che delimita il nucleoplasma e il suo contenuto di cromatina dal citoplasma è l'Involucro Nucleare o Envelope (EN), composto da due membrane fosfolipoproteiche concentriche, ciascuna spessa 8 nm circa, che delimitano uno spazio in continuità col RER, chiamato "cisterna perinucleare". Le due membrane, suddivisibili in "esterna" e "interna", hanno composizione differente sia in fosfolipidi che in proteine: la membrana interna (ma solo delle cellule animali) risulta inoltre rivestita sul lato nucleoplasmatico da una fitta maglia di proteine, chiamata Lamina Nucleare (LN). Oltre alla Lamina periferica che riveste l'EN, ci sono sostanziali evidenze che le lamine, le proteine che costituiscono la LN, formino strutture anche nel



THE CELL, Third Edition, Figure 8.4 ASM Press and Sinauer Associates, Inc. © 2003 All rights reserved.

Figura 1.1: Processo di assemblaggio delle lamine tramite interazione testa coda dei dimeri. I dimeri polimerizzati interagiscono tra di loro a formare la Lamina Nucleare.

nucleoplasma. Queste possono apparire sia come foci distinti che come un “velo” che riempie il nucleoplasma, come mostrato da studi di *imaging* tramite immunofluorescenza o *imaging* su cellule vive trasfettate con proteine taggate con GFP [1]. La LN risulta dalla polimerizzazione di diversi dimeri di lamina, (Fig. 1.1) che interagiscono tra loro associandosi in maniera testa-coda. Tale interazione è però transiente, venendo disfatta durante la transizione tra profase e metafase nelle cellule in divisione; questo processo di disassemblaggio della LN è regolato dalla fosforilazione delle lamine ad opera di proteine deputate al controllo del ciclo cellulare, come Cdc2. Dopo la mitosi, le lamine sono defosforilate e la LN riassemblata[2].

1.1 Le lamine formano la Lamina Nucleare

Le lamine[3] fanno parte della super famiglia dei Filamenti intermedi (FI), classificate come FI di tipo V e localizzate principalmente sulla superficie interna dell’EN, ma presenti anche, in più basse concentrazioni, nel nucleo-

plasma. Sono espresse in quasi tutti i metazoi, risultando invece assenti in lieviti e piante; le lamìne dei vertebrati risultano del tutto simili alle altre proteine appartenenti alla famiglia dei filamenti intermedi localizzati questa volta nel citoplasma, ma hanno alcune caratteristiche (e funzioni) che le contraddistinguono: come tutti i filamenti intermedi, le lamìne contengono un dominio superavvolto ad asta, altamente conservato, composto da eptameri ripetuti di amminoacidi, fiancheggiato da un dominio di testa N-terminale che presenta variabilità e un dominio di coda C-terminale; tuttavia, il dominio centrale ad asta delle lamìne ha 42 amminoacidi addizionali (6 eptameri ripetuti) dentro il coil 1B, rispetto ad altri filamenti intermedi citoplasmatici espressi nei vertebrati; inoltre, il dominio di testa delle lamìne risulta più piccolo rispetto a quello degli altri filamenti intermedi citoplasmatici. Il dominio di coda contiene invece 1) un segnale di localizzazione nucleare (NLS, *Nuclear Localization Signal*), che è necessario per il loro trasporto attivo verso il nucleo dopo la sintesi e 2) un motivo immunoglobulinico-simile posizionato più distalmente rispetto all' NLS. (Fig. 1.2)

Molte lamìne contengono un motivo conservato composto da quattro amminoacidi: Cisteina - amminoacido alifatico - amminoacido alifatico - amminoacido X (CaaX) in prossimità dell'estremità carbossi-terminale, a partire dal quale iniziano una serie di reazioni enzimatiche che portano alla farnesilazione, prima, e alla carbossimetilazione, poi, della Cisteina presente nel motivo e ad un successivo taglio endoproteolitico della restante parte (-aaX)[4]. L'amminoacido X è generalmente una Metionina, una Serina, una Alanina o una Leucina e ha la funzione di definire la specificità per l'aggiunta del gruppo isoprenile: Metionina, Serina o Alanina specificano per l'aggiunta di un residuo farnesilico e la Leucina specifica per l'aggiunta di un gruppo geranil-geranil. In ultimo, a differenza dei filamenti intermedi citoplasmatici, le lamìne contengono anche un sito riconosciuto dalle proteine chinasi attive in mitosi, la cui fosforilazione dirige il disassemblamento della LN durante questa fase del ciclo cellulare.

Secondo la classificazione in uso, le lamìne si dividono generalmente in lamìne di tipo A e lamìne di tipo B [1], in base alla loro similarità di struttura e al punto isoelettrico (Tabella 1.1). Nei mammiferi, tre geni codificano per

Tabella 1.1

<i>Lamine presenti nell'uomo e loro espressione</i>		
Proteina	Espressione	Gene
Lamina A	Maggior parte delle cellule somatiche differenziate	<i>LMNA</i>
Lamina C	Maggior parte delle cellule somatiche differenziate	<i>LMNA</i>
Lamina C2	Linea germinale	<i>LMNA</i>
Lamina A Δ 10	Non chiara	<i>LMNA</i>
Lamina B1	Maggior parte delle cellule somatiche differenziate	<i>LMNB1</i>
Lamina B2	Maggior parte delle cellule somatiche differenziate	<i>LMNB2</i>
Lamina B3	Linea germinale	<i>LMNB2</i>

le lamine: per quanto riguarda l'uomo, il gene *LMNB1* sul cromosoma 5 codifica per la lamina B1, che è espressa in quasi tutte le cellule somatiche. Il gene *LMNB2* sul cromosoma 19 codifica sia per la lamina B2, anch'essa espressa in quasi tutte le cellule somatiche, che per la lamina B3, una isoforma specifica per le cellule della linea germinale che deriva da un evento di splicing alternativo [5]. Le lamine di tipo A sono codificate dal gene *LMNA*, lungo 57,6 Kb e posizionato sul cromosoma 1. Tramite splicing alternativo dei suoi 12 esoni, quattro proteine possono essere differenzialmente espresse: due prodotti minori: la lamina A Δ 10 (scarsamente studiata) e la lamina C2 e due prodotti maggiori, lamina A e lamina C. La lamina A è codificata dagli esoni 1-12 mentre la lamina C deriva un evento di splicing alternativo a livello dell'introne 10 del gene *LMNA*. Quindi, la lamina C differisce dalla A per la sua regione al C-terminale, mancando della parte finale dell'esone 10 così come dell'esone 11 e 12. Insieme, le due proteine formano un eterodimero attraverso l'interazione dei loro domini ad asta centrali al fine di creare una struttura filamentosa che concorre all'assemblamento della Lamina Nucleare [6]. La lamina A e le lamine di tipo B (B1 e B2) ma non la C presentano tutte il motivo CaaX posto all'estremità C-terminale. Queste proteine subiscono infatti una serie di modifiche prima di raggiungere la loro forma matura, modifiche che coinvolgono proprio il motivo CaaX.

Il primo passaggio verso la forma matura di queste lamine riguarda l'aggiunta di un isoprenoide farnesilico di quindici atomi di carbonio ad opera

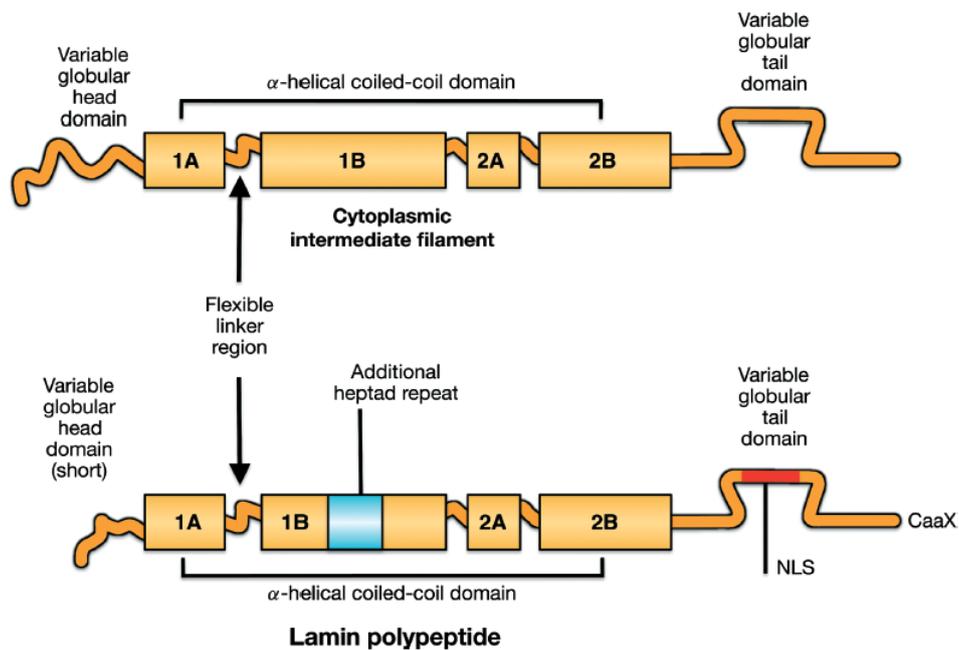


Figura 1.2: Tutti i filamenti intermedi, incluse le lamine, hanno un dominio strutturale conservato che consiste in un dominio ad asta di α -eliche *coiled-coil*, costituito da quattro domini superavvolti (1A, 1B, 2A, 2B), basati su eptadi ripetuti e interrotti da domini linker flessibili. Comparati con altri filamenti intermedi citoplasmatici dei vertebrati, le lamine contengono 6 ripetizioni di eptadi aggiuntive (42 amminoacidi in blu) nell'elica 1B, un segnale di localizzazione nucleare NLS vicino al dominio immunoglobulinico simile. In molte lamine al C-terminale è presente anche un motivo CaaX bersaglio delle modifiche postraduzionali. Adattato da Worman HJ, 2012[3].

dell'enzima farnesiltransferasi (FTasi) sulla Cisteina del motivo CaaX [3, 7]. Le lamine farnesilate sono poi modificate da una endoproteasi specifica che riconosce il motivo CaaX prenilato e che rimuove il tripetide (-aaX) che segue la Cisteina, sia dalla prelamina A (nome della forma immatura della proteina lamina A) che dalle prelamine di tipo B. L'enzima RCE1 (*RAS converting enzyme 1*) solo è responsabile del taglio del tripeptide nelle lamine di tipo B, mentre RCE1 e/o ZMPSTE24, una metalloproteasi a zinco, sono implicati nel taglio del tripetide -SIM dal motivo CSIM (CaaX) della prelamina A. La Cisteina rimanente, farnesilata, è poi ulteriormente metilata ad opera di un enzima isoprenilcisteina carbossimetiltransferasi (Icmt) (Fig. 1.3). Mentre le lamine di tipo B rimangono permanentemente farnesilate e carbossimetilate, la prelamina A va incontro ad un ulteriore processamento mediato sempre da ZMPSTE24, che taglia diciotto amminoacidi dal C-terminale, compresa la Cisteina modificata, rilasciando la forma matura, non farnesilata e non metilata, della lamina A. È interessante notare come l'estremità carbossiterminale della lamina A vada incontro ad una modifica ingente, quale l'aggiunta di una coda farnesilica, che poi viene interamente rimossa. Il preciso ruolo di questo processo non è ben chiaro: è possibile ipotizzare che, dato che la farnesilazione e la carbossimetilazione aumentano l'idrofobicità della proteina, queste modifiche facilitino il targeting della lamina A sul EN (l'aggiunta del motivo farnesilico permetterebbe alla lamina A di localizzarsi alla periferia del nucleo dove il taglio proteolitico finale avviene); ci sono studi che dimostrano come la lamina A matura generata bypassando questi processamenti seriali 1) o tramite appositi mutanti nel motivo CaaX, 2) o tramite uso di specifici inibitori per la produzione di residui farnesilici, 3) o ancora con inibitori per la farnesiltransferasi, generi fenotipi alterati della morfologia nucleare correlati anche allo sviluppo di gravi patologie nei modelli animali [8–11]. Il destino del peptide al carbossi-terminale rimosso da ZMPSTE24, inoltre, non è conosciuto: potrebbe rimanere ancorato alla membrana o essere rapidamente degradato. Ma tutto ciò porta a supporre che il processo di maturazione a cui va incontro la lamina A sia fondamentale, in tutti i suoi passaggi, per il corretto assemblaggio della Lamina Nucleare.

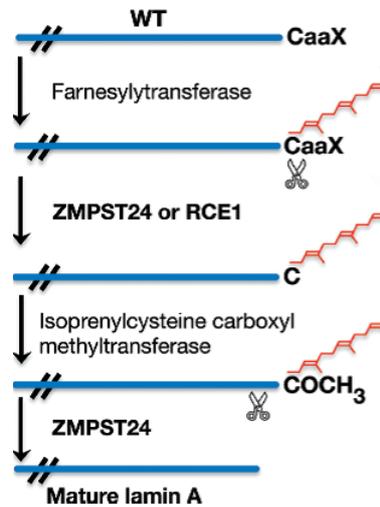


Figura 1.3: Il processamento della prelamin A consta di una serie di reazioni enzimatiche che portano alla farnesilazione, un taglio endoproteolitico del tripeptide -aaX, una carbossimetilazione e infine un secondo taglio endoproteolitico catalizzato da ZMPSTE24. Adattato da Worman HJ, 2012[3].

1.1.1 Il ruolo della Lamina Nucleare nella vita della cellula

Diverse funzioni fisiologiche sono attribuibili alla LN. Vi è un esteso consenso scientifico nell'affermare che la principale sia quella di fornire un supporto strutturale al nucleo (ci sono evidenze ultrastrutturali che mostrano le lamine formare un nucleoscheletro distribuito in tutto il nucleoplasma), agendo anche nella regolazione del posizionamento dei Complessi del Poro Nucleare [1, 7]. Un'altra funzione importante della LN riguarda la regolazione dell'organizzazione della cromatina e dell'espressione genica: è ormai chiaro che il riposizionamento dei geni in prossimità della Lamina nucleare, alla periferia del nucleo, porti alla repressione della loro trascrizione, ma l'esatto ruolo fisiologico delle lamine nell'espressione genica rimane sconosciuto. L'eterocromatina è altamente organizzata nelle cellule di mammifero ed è localizzata a livello dei nucleoli e in prossimità della LN; ma nonostante si pensi che essa costituisca, in generale, un ambiente di repressione genica, altre regioni della Lamina, non associate alla eterocromatina, potrebbero essere coinvolte altresì nell'incremento dell'espressione. I cromosomi sono organizzati in "territori"

ben definiti all'interno dei nuclei di cellule di mammifero e questi territori sono organizzati in maniera non casuale, con i cromosomi "ricchi in geni" posizionati preferenzialmente nelle regioni più interne del nucleo e cromosomi "poveri in geni" posizionati nei dintorni della Lamina. I modelli più recenti sull'architettura nucleare vedono la LN e le proteine ad essa associate assolvere un ruolo determinante nel posizionamento dei cromosomi nel nucleo: così le lamìne potrebbero ancorare in maniera diretta o indiretta la cromatina alla LN e potrebbero agire anche come impalcatura per la cromatina in altre regioni interne del nucleo. L'interazione tra lamìne e cromatina sembra coinvolgere i domini di coda C-terminale non strutturati ad α -elica e i domini di coda N e C-terminale delle proteine del core istonico. Questa interazione potrebbe coinvolgere il domino NLS presente sulle lamìne ed è stato anche riportato che tali proteine potrebbero legare direttamente il DNA senza bisogno di intermediari [7, 12]. Alcuni ricercatori suggeriscono un'implicazione delle lamìne di tipo B in alcuni processi biologici fondamentali, inclusa la replicazione del DNA e la formazione del fuso mitotico [13, 14]. Durante la mitosi, sia le lamìne di tipo A che quelle di tipo B vengono disassemblate tramite un meccanismo attivato dalla fosforilazione e vengono defosforilate una volta che hanno preso parte alla formazione del nuovo nucleo nella cellula figlia. Mentre le lamìne di tipo B si ricollocano principalmente alla periferia dei nuclei nelle cellule figlie, le lamìne di tipo A (A e C) sono presenti anche nel nucleoplasma sia alla fine della mitosi che per tutta l'interfase e sembrano assumere un ruolo attivo nella proliferazione cellulare mediata da Rb (proteina Retinoblastoma), nell'inizio della replicazione del DNA e nello splicing dell'RNA (sebbene per quest'ultima funzione ci siano ancora molti punti da chiarire). Le lamìne sembrano avere anche un ruolo nella stabilità meccanica nel nucleo e nel mantenimento delle proprietà meccaniche dell'intera cellula. Per esempio, cellule non esprimenti le lamìne A e C mostrano una meccanotrasduzione alterata, una diminuzione della rigidità meccanica e una migrazione cellulare compromessa. Questi cambiamenti nelle proprietà micromeccaniche possono essere spiegati in ultima analisi da alterazioni nei collegamenti tra il nucleoscheletro e il citoscheletro, collegamenti mediati da diverse proteine situate sul versante interno della membrana nucleare o sulla

membrana nucleare esterna [15]. Considerando i molteplici – e importanti – ruoli sia strutturali che funzionali svolti dalla LN e quindi dalle proteine che la compongono, si può facilmente intuire come qualsiasi alterazione delle lamine, a partire da quelle genetiche, possa riflettersi in una compromissione dei principali *network* nucleo-citoplasmatici e, in ultima analisi, a danni sistemici a livello di tessuti e organi. Molte patologie di origine genetica, rare e scarsamente studiate, sono causate da mutazioni a livello dei geni codificanti per le lamine. Esse prendono il nome di laminopatie.

1.1.2 Le laminopatie

Nel 1999[16] – quindi in tempi estremamente recenti se comparati a quelli che riguardano la caratterizzazione di altre patologie, anche con origine genetica – fu scoperto che mutazioni del gene *LMNA* erano responsabili dell’insorgenza della distrofia muscolare autosomica dominante Emery-Dreifuss. Questa scoperta ha dato il via, per i dieci anni successivi, a studi che hanno permesso di identificare altre mutazioni nel gene *LMNA* causanti più di una dozzina di rari disordini clinici che hanno poi preso il nome collettivo di laminopatie; tuttavia la comprensione della patogenesi, ovvero del ruolo svolto dalle lamine alterate nell’insorgenza delle malattie, non è affatto completa. Le prime laminopatie individuate erano malattie a carico dei muscoli striati: la distrofia muscolare autosomica dominante di Emery-Dreifuss è caratterizzata da una precoce contrattura delle articolazioni, che coinvolge primariamente i gomiti, le caviglie e il collo, seguita da una progressiva debolezza muscolare, prima agli arti superiori e gambe e progressivamente ai muscoli delle spalle e delle anche. Il rischio maggiore per la salute dell’individuo malato, però, deriva dall’insorgenza di una cardiomiopatia dilatativa. Mutazioni al gene *LMNA* sono anche associate con casi di distrofia muscolare congenita, con coinvolgimento del cuore e presenza di “sindrome mano-cuore”, nella quale la cardiomiopatia è associata ad una struttura anomala dell’arto superiore sinistro (Fig. 1.4).

Nel 2000 [17], molti gruppi di ricerca dimostrarono che alcune mutazioni del gene *LMNA* causavano anche anomalie del tessuto adiposo, ovvero la

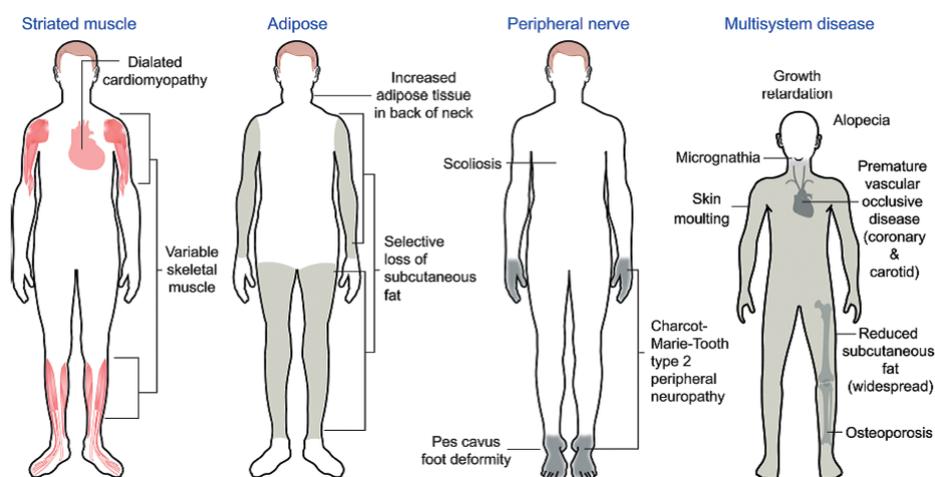


Figura 1.4: Molte mutazioni sul gene *LMNA* sono dominanti autosomiche e causano cardiomiopatia dilatativa con variabile interessamento a livello della muscolatura scheletrica. Altre mutazioni, come quelle che interessando il dominio immunoglobulinico simile provocano lipodistrofia parziale, con perdita del grasso sottocutaneo alle estremità del corpo. La mutazione A298C è invece associata ad una neuropatia periferica. Nella figura più a destra è invece riportato il complesso quadro di sintomatologie associate ad una mutazione silente G608G. Adattato da Worman HJ, 2012[3].

Lipodistrofia familiare parziale di tipo Dunningan. E' una malattia di tipo autosomico dominante che presenta perdita di tessuto adiposo negli arti e si manifesta nel periodo della pubertà, con conseguente insulino resistenza, diabete mellito, ipertrigliceridemia e altre complicazioni come la steatosi epatica. L'85-90% delle mutazioni che causano questa malattia sono localizzate nell'esone 8 del gene *LMNA* e portano ad una sostituzione amminoacidica che modifica la carica superficiale del dominio immunoglobulinico-simile nella coda carbossi terminale delle lamine A e C. Un'altra mutazione del gene *LMNA* dovuta ad una sostituzione in omozigosi di una Cisteina in una Arginina nella posizione 298 del dominio ad asta centrale è stata riportata [18] come causa di una neuropatia periferica autosomica recessiva, chiamata Charcot-Marie-Tooth di tipo 2. I soggetti affetti soffrono di una neuropatia assonale periferica con variabilità per quanto riguarda l'età di comparsa e l'andamento della malattia.

Mentre le mutazioni nel gene *LMNA* causano diversi fenotipi alterati, poche mutazioni nel gene codificante le lamine di tipo B che causano patologie

sono state riportate. La duplicazione del gene *LMNB1*, che porta ad un aumento dell'espressione della lamina B1, causa nell'adulto una leucodistrofia autosomica dominante, un disordine neurologico a lenta progressione caratterizzata da una simmetrica perdita diffusa di mielina nel Sistema Nervoso Centrale. Comunque, il panorama delle sintomatologie e delle anomalie a livello di organi e tessuti è vasto e molte laminopatie mostrano un'ampia sovrapposizione di sintomi per quanto riguarda i fenotipi alterati. In accordo con lo studio proposto in questa tesi, una particolare laminopatia verrà descritta in maniera più dettagliata: tale è la Sindrome di Hutchinson-Gilford.

1.1.2.1 La sindrome di Hutchinson-Gilford o sindrome progerinica

La sindrome di Hutchinson-Gilford [19, 20] (abbreviata in HGPS, *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*), chiamata anche semplicemente Progeria (da greco dal greco $\pi\rho\sigma$, "prima" e $\gamma\epsilon\rho\omega\eta$, "vecchio, anziano"), in accordo con i caratteri di senilità che costituiscono una caratteristica fondamentale della malattia sin dal suo esordio, è una sindrome sporadica, dominante e autosomica. I neonati affetti da HGPS appaiono solitamente normali alla nascita, ma entro il primo anno di vita iniziano a manifestare i segni di un invecchiamento accelerato. I bambini mostrano un ritardo nella crescita, sono bassi di statura e sotto peso; a causa della perdita di grasso subcutaneo, la pelle appare rugosa e invecchiata. Altre caratteristiche anomale sono il ritardo nella dentizione, micrognatismo, voce acuta, torace piriforme e displasia dell'anca. All'età di 10 anni, un bambino malato ha gli stessi problemi respiratori, cardiovascolari e artritici di un paziente anziano. In media, la morte sopraggiunge all'età di 13 anni, con almeno il 90% di decessi causati da progressiva aterosclerosi coronarica e delle arterie cerebrali. L'incidenza dell'HGPS è di 1 su 8 milioni nati, ma potrebbe essere più prossima all'1 su 4 milioni, prendendo in considerazione casi non segnalati o mal diagnosticati. Dal 1886, più di 100 casi di HGPS sono stati riportati e attualmente ci sono 40 casi conosciuti nel mondo.

Questa sindrome è causata da un singolo evento di trasversione sporadica di una Citosina in una Timina nel codone 608 dell'esone 11 del gene *LMNA*. La sostituzione avviene a livello di un dinucleotide CpG altamente mutabile,

ovvero originata a partire da una Citosina metilata che viene successivamente deamminata a Timina. Uno studio recente sugli alberi genealogici di famiglie con bambini affetti da HGPS mostra che tale mutazione *de novo* avviene preferenzialmente nell'allele *LMNA* paterno: un fenomeno simile è stato precedentemente osservato in altri disordini genetici come, ad esempio, l'acondroplasia; molti di questi disordini sono stati associati all'età avanzata del genitore maschio: è stato infatti ipotizzato che l'aumento dell'età genitoriale maschile possa incrementare il numero di spermatozoi con mutazioni a livello genomico[21]. La trasversione C → T nel nucleotide 1824 del gene (C1824T), corrispondente al codone 608 (GGC → GGT), non provoca un cambiamento nell'amminoacido codificato dal codone, che resta sempre la Glicina (G608G), per cui appare lecito domandarsi come possa una mutazione silente causare un così devastante fenotipo. Ebbene, la mutazione al codone 608 provoca la creazione di un sito di splicing alternativo, la cui attivazione porta alla produzione di un trascritto mancante di 150 nucleotidi appartenenti all'esone 11. Sebbene la lettura rimanga *in frame*, la proteina risultante avrà una delezione interna di 50 amminoacidi prima della traduzione dell'esone 12, e tale mancanza ricade interamente sul processo di maturazione della lamina che risulta impossibilitato a concludersi.

Nella sindrome di Hutchinson-Gilford, quindi, la prelamina A risulta non completamente processata: essa va incontro comunque alla farnesilazione e alla carbossimetilazione sulla Cisteina del motivo CaaX ma il taglio proteolitico finale che rimuove le modifiche precedentemente menzionate non avviene, a causa dell'assenza del sito riconosciuto dalla metalloproteasi ZMPSTE24, posizionato proprio in quei 50 amminoacidi deleti dall'evento di splicing alternativo. La proteina così diversamente processata prende il nome di progerina e l'espressione di tale proteina farnesilata in modo anomalo appare importante nella patofisiologia del fenotipo progerinico (Fig. 1.5). Una mutazione in omozigosi nel gene che codifica per ZMPSTE24 porta anch'essa ad una analoga sindrome progeroide, proprio a testimonianza del fatto che è il difetto di questa fase della maturazione ad essere critico per l'insorgenza del grave fenotipo alterato. A livello cellulare, la prima osservazione fisiopatologica nell'HGPS è che la mutazione nel gene *LMNA* generalmente porta ad una

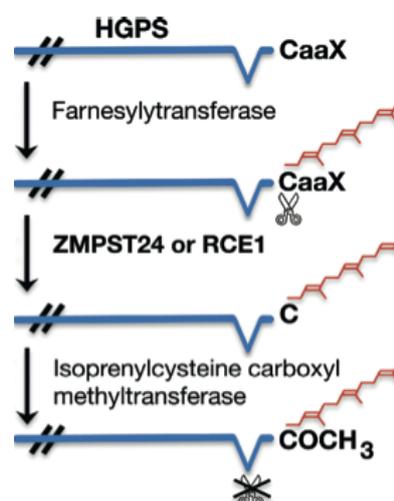


Figura 1.5: Da confrontare con Fig. 1.3. La proteina non subisce il taglio endoproteolitico conclusivo ad opera di ZMPSTE24 a causa della delezione del sito riconosciuto dall'enzima. Pertanto, nella progerina la Cisteina terminale risulta carbossimetilata e con l'aggiunta della coda farnesilica. Adattato da Worman HJ,2012[3].

morfologia del nucleo anomala: i nuclei sono irregolari nella forma, con lobulazioni e erniazioni dell'EN e ispessimento della LN; inoltre, i Complessi dei Pori Nucleari clusterizzano, le lamine di tipo B risultano mal localizzate e si rileva una diffusa perdita di eterocromatina periferica. Sebbene le alterazioni nella morfologia nucleare siano state ampiamente esaminate sia in cellule in coltura trasfettate, sia in fibroblasti di pazienti umani affetti e in fibroblasti di modelli murini della malattia, la connessione con il fenotipo macroscopico rimane sconosciuta. Quello che è certo, però, tramite studi eseguiti su modelli murini per la sindrome di Hutchinson-Gilford, è che tale connessione sussiste: i topi con il gene codificante per ZMPSTE24 deletato mostrano un fenotipo progeroide; inoltre sia l'espressione di una prelamina A mutata nel motivo CaaX, sia il trattamento con inibitori della farnesiltransferasi (FTasi) migliorano il fenotipo anomalo e prolungano la vita degli animali modello per l'HGPS[22]. Questi e molti altri studi, quindi, hanno permesso di stabilire che è la persistenza del residuo farnesilico sulla prelamina A ad essere responsabile della fisiopatologia della Hutchinson-Gilford, ma su come questo si rifletta in una così vasta quantità di anomalie sistemiche sono disponibili solo ipotesi.[4, 23]

1.1.2.2 Come fa la mutazione nel gene LMNA a causare la malattia?

I ricercatori hanno proposto due ipotesi non esclusive per cercare di rispondere a questa domanda. Secondo uno studio di Womrman e Courvalin[24] la malattia agirebbe in modo duplice, provocando: (1) difetti meccanici del nucleo (2), interazioni anomale con alcuni fattori di trascrizione e conseguenti errori nella regolazione dell'espressione genica. La prima ipotesi, quella da "stress meccanico", afferma che le anomalie osservate nella struttura nucleare nelle cellule esperimenti la progerina portano ad un aumento della suscettibilità a danni indotti da stress fisici. La seconda ipotesi, quella da "espressione genica", propone che l'EN giochi un ruolo comprimario nell'espressione genica tessuto specifica e che questa possa essere alterata dalle mutazioni nelle lamine: si basa principalmente sull'interazione osservata tra l'EN e le componenti della cromatina. Questo tipo di ipotesi risulta difficile da dimostrare, a causa della scarsità di materiale biologico reperibile da pazienti malati di HGPS su cui valutare l'espressione tessuto specifica, ma questo problema è stato in parte risolto dal lavoro importante di Colin Stewart che ha generato topi mutanti *knockout* per le lamine A e C [25].

Due distinti lavori cercano di far luce sulla eventuale validità delle due ipotesi proposte utilizzando animali modello per l'HGPS. Lo studio di Nikolaova [26] si concentra principalmente sul tessuto cardiaco di topi mutanti che avevano sviluppato cardiomiopatie dilatatorie: i miociti mostravano un'architettura nucleare anomala, con frammenti di eterocromatina centromerica rilocalizzati dalla periferia verso l'interno del nucleo, per cui i ricercatori hanno proposto che queste alterazioni potessero essere associate a possibili difetti nel trasporto nucleocitoplasmatico e dell'espressione genica. In questo studio viene dunque messo in luce il cambiamento massiccio a cui va incontro la cromatina nelle cellule esperimenti la progerina e si prova ad ipotizzare come questo possa portare a conseguenze patologiche: in generale c'è una correlazione tra l'attività dei geni e la loro localizzazione nell'ambiente intranucleare, con i geni fisicamente localizzati alla periferia del nucleo che sono solitamente inattivi. Cambiamenti dinamici nell'attivazione genica sono frequenti duran-

te il differenziamento cellulare, con geni inizialmente espressi che si spostano verso la periferia del nucleo, vicino all'eterocromatina centromerica, e altri silenziati che sono trasferiti verso zone più centrali, in un ambiente eucromatico. Un meccanismo di riorganizzazione simile agisce nei nuclei dei mioblasti in differenziamento nel tessuto cardiaco o anche come risposta protettiva nei miociti già differenziati. In conclusione, l'espressione di una lamina A farne-silata e quindi la conseguente anomalia nell'organizzazione della LN potrebbe portare ad una inappropriata attivazione o, viceversa, ad una repressione di alcuni geni importanti per il differenziamento, con risultante sviluppo di una miopatia; a supporto di questa teoria ci sono altri studi in cui si evidenzia che numerosi geni risultano differenzialmente espressi nelle cellule HGPS rispetto a cellule normali: si registra in cellule trasfettate con progerina una diminuzione dei trascritti sintetizzati dall'RNA polimerasi II e in particolar modo i fattori di trascrizione sono la categoria funzionale maggiormente alterata nell'espressione in cellule HGPS[27, 28]. Lo studio di Lammerding[29], invece, esplora la possibilità che siano le proprietà meccaniche del nucleo alterate in caso di espressione di progerina ad essere responsabili del complesso e diversificato fenotipo che si osserva. Sempre partendo da animali modello per HGPS, Lammerding impiegò fibroblasti embrionali in coltura di topo per i suoi studi; anche se il tessuto connettivo non presenta anomalie nei topi HGPS, i fibroblasti mostravano nuclei deformati con evidenti modifiche a livello ultrastrutturale, cosa che valida l'uso di questo tipo cellulare. I risultati di questo studio dimostrarono che il citoplasma e il nucleo hanno una minore rigidità e che in risposta a stimoli meccanici, i fibroblasti presentano un'aumentata deformazione nucleare, difetti nella meccanotrasduzione, un'attenuazione dell'espressione dei geni meccanosensitivi attivati da NF-kB e una diminuzione della vitalità cellulare.

Questi due studi suggeriscono quindi un effetto sinergico nella determinazione del fenotipo HGPS sia da parte della meccanica nucleare alterata sia da parte dell'alterazione nell'espressione genica. La relazione però che c'è tra la malattia e l'invecchiamento precoce e il manifestarsi di sintomi tipici dell'età avanzata non è chiara. Tuttavia, alcuni studi suggeriscono che di per sé lo splicing aberrante della prelamina A possa giocare un ruolo anche

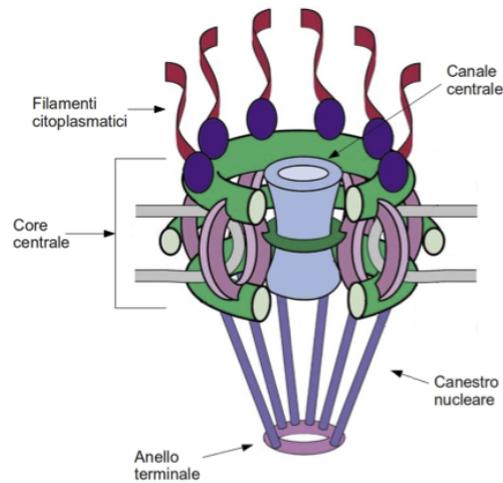
nel fisiologico processo di invecchiamento. Inoltre, alterazioni nel normale processamento della prelamina A sono state osservate in modelli di studio per l'invecchiamento del sistema vascolare senza che ci fossero mutazioni a livello del gene LMNA, come dimostrato da recenti studi in cui appare che la prelamina A si accumula nelle cellule muscolari lisce dei vasi in individui anziani e non nei giovani [30]. In questo caso, l'accumulo della prelamina A sembra essere il risultato della decrescita dei livelli di ZMPSTE24, suggerendo un declino età-dipendente di questo importante enzima. L'idea che il normale *pathway* enzimatico che porta all'espressione della lamina A matura sia un sistema altamente delicato è supportata da studi che hanno dimostrato come perturbazioni che colpiscono la cinetica della maturazione della lamina A possono portare la cellula ad un "fenotipo invecchiato" in maniera accelerata, concetto supportato anche da studi su animali modello [31, 32]

1.2 Il trasporto nucleocitoplasmatico

L'ultimo componente che rimane da descrivere per completare il complesso quadro della comunicazione tra nucleo e citoplasma, avente il dirimente ruolo di regolare il traffico di macromolecole, è il Complesso del Poro Nucleare che costituisce l'unica via di ingresso e uscita tra nucleoplasma e citoplasma. Localizzati lungo tutto l'EN, gli NPC[33, 34] (*Nuclear Pore Complex*) sono tra i complessi di dimensioni maggiori all'interno della cellula con un peso molecolare di circa 50 MDa, costituiti da oltre 500 diverse proteine - le nucleoporine - appartenenti a 30 diverse tipologie. Il numero di NPC per ogni cellula può variare di molto: in una cellula umana proliferante sono stati contati circa 10/20 NPC/ μ^2 , quindi all'incirca 2000/5000 NPC per nucleo.

1.2.1 Complessi del Poro Nucleare

Al microscopio elettronico, l'NPC appare come una complessa struttura cilindrica con una forte simmetria ottagonale, misurante tra i 100 e i 150 nm in diametro e 50-70 nm in spessore, in base all'organismo preso in esame. Le due membrane del NE, quella esterna e quella interna, si uniscono a livello di una giunzione che curva il bilayer fosfolipidico di entrambe le membrane



h

Figura 1.6: Schematizzazione della struttura dell'NPC in cui vengono riportati i principali domini funzionali del Complesso: filamenti citoplasmatici, canale centrale e canestro nucleare. Adattato da Suntharalingam e Wentz, 2003[35].

e forma una apertura in cui si assemblano le proteine del NPC. Schematizzando, ogni Poro può essere suddiviso in tre distinti domini strutturali: 1) le fibrille citoplasmatiche, filamenti lunghi 50 nm che si estendono dal Poro verso il citoplasma, 2) un core centrale con otto raggi che circondano il canale centrale o CGC (*Central Gate Channel*) lungo 50 nm e 3) i filamenti nucleoplasmatici che raggiungono la lunghezza di 100 nm e sono raccolti all'estremità distale in un anello proteico che forma con essi la struttura caratteristica ad anello (Fig. 1.6). Degne di menzione tra le nucleoporine che costituiscono il CGC risultano essere le così dette FG Nups, così chiamate perché contengono regioni ricche in FG, piccoli cluster idrofobici contenenti il dipeptide FG, oppure le brevi sequenze FXFG o GLFG. Queste proteine potrebbero avere un ruolo nell'attraversamento del cargo attraverso il CGC, fornendo siti di interazione per i vari fattori di trasporto. Con 5-50 ripetizioni FG per ciascuna di queste nucleoporine e 200 circa FG Nup per ciascun NPC, ci sono potenzialmente più di mille siti di legame per questi fattori lungo tutto il canale che separa i due compartimenti.

1.2.2 Il processo di import nucleare

Studi effettuati con destrani marcati con fluorofori o con particelle d'oro microiniettate nella cellula, hanno definito il limite pratico di permeabilità dell'NPC, dimostrando che in condizioni fisiologiche le macromolecole più grandi di 40kDa non mostrano una misurabile redistribuzione tra citoplasma e nucleo e quindi nessun movimento attraverso l'NPC [33]. Al contrario, ioni metallici, piccoli metaboliti e molecole più piccole di 40 kDa o di diametro inferiore ai 5 nm possono diffondere passivamente in maniera relativamente libera. L'NPC è capace di trasportare cargo anche superiori ai 40 nm di diametro: si pensi alle subunità ribosomiali o ai capsidi virali, che si muovono da e verso il nucleo come complessi già assemblati. Affinché avvenga la traslocazione attiva di queste macromolecole attraverso l'NPC sono richiesti dei fattori di trasporto solubili. Molte delle proteine che assolvono questo compito appartengono alla famiglia delle karioferine- β : quelle deputate all'importo nucleare vengono chiamate importine, mentre quelle responsabili dell'esporto vengono chiamate esportine; se ne contano all'incirca 20 tipi diversi nelle cellule umane e la maggior di esse interagisce direttamente con le molecole cargo, mentre alcune necessitano di proteine adattatrici per riconoscere il cargo e tra queste le più studiate e rappresentate nella cellula sono le karioferine- α o importine- α . Considerando la discrepanza tra numero di karioferine disponibili per il riconoscimento del cargo e il numero di possibili bersagli molecolari trasportati dentro e fuori il nucleo, appare evidente che debba esserci un sistema identificativo ripetibile per il riconoscimento dei cargo da parte delle karioferine. A tale scopo esistono sequenze segnale amminoacidiche contenute nella struttura primaria delle proteine cargo, chiamate NLS per l'import verso il nucleo (*Nuclear Localization Signal*) e NES per l'uscita dal nucleo (*Nuclear Export Signal*). Le prime proteine per le quali è stato dimostrato il trasporto verso il nucleo sono state la nucleoplasmina e l'antigene T del virus SV40. L'NLS della nucleoplasmina presenta due gruppi di residui carichi positivamente separati da una sequenza spaziatrice di 10 amminoacidi (KR-10aa-KKKL), mentre l'NLS dell'antigene T del virus SV40 presenta la sequenza, sempre ricca di cariche positive, PKKKKRKV.

Dunque le modalità di trasporto attraverso le NPC sono due:

- La diffusione passiva che riguarda molecole più piccole di 5.000 Da ma anche molecole più grandi, fino a 40kDa che, seppur prive di segnali di localizzazione nucleare, diffondono passivamente con velocità inversamente proporzionale alla loro massa.
- Il trasporto facilitato o attivo, mediato dalle karioferine, che riconoscono i segnali di localizzazione nucleare e di export nucleare, presenti nella struttura primaria delle proteine cargo.

A completamento del complesso sistema funzionale e strutturale fornito dagli NPC, tra nucleoplasma e citoplasma sussiste un gradiente della proteina Ran (una piccola GTPasi di 25 kDa simile a Ras citoplasmatica) che consente il controllo della direzionalità del traffico molecolare, impedendo alle molecole destinate al nucleo di fuoriuscirvi una volta consegnate (e viceversa). Gli studi *in vitro* hanno dimostrato che il complesso di import viene disassociato dal legame con RanGTP, invece il complesso di export si forma con l'associazione a RanGTP. Basandosi sulla localizzazione citoplasmatica della Proteina Attivatrice di Ran, RanGAP, e sulla localizzazione nucleoplasmatica del Fattore di Scambio Guanosinico, la RanGEF, la Ran citoplasmatica si trova principalmente nello stato legante GDP, mentre la Ran nucleoplasmatica lega principalmente il GTP.

L'evento citoplasmatico iniziale nell'import di proteine nucleari[36] con sequenza di localizzazione NLS, risulta essere il legame del substrato da importare con l'eterodimero importina- α / β . L'Importina- α fornisce il sito che riconosce l'NLS e interagisce tramite il suo dominio di legame per l'importina- β (IBB) con quest'ultima. L'importina- β , infine, è in grado di interagire con alcune nucleoporine dell'NPC (Fig. 1.7). La traslocazione nel nucleo termina con il disassemblaggio del trimero NLS/importina- α / β ma è effettivamente solo l'importina- β a consentire la migrazione attraverso l'NPC, mentre il complesso NLS/importina- α si comporta con un cargo inerte durante l'import (infatti per certi cargo la mediazione dell'importina- α non è richiesta ed è unicamente l'importina- β a legare l'NLS del cargo e permettere il passaggio

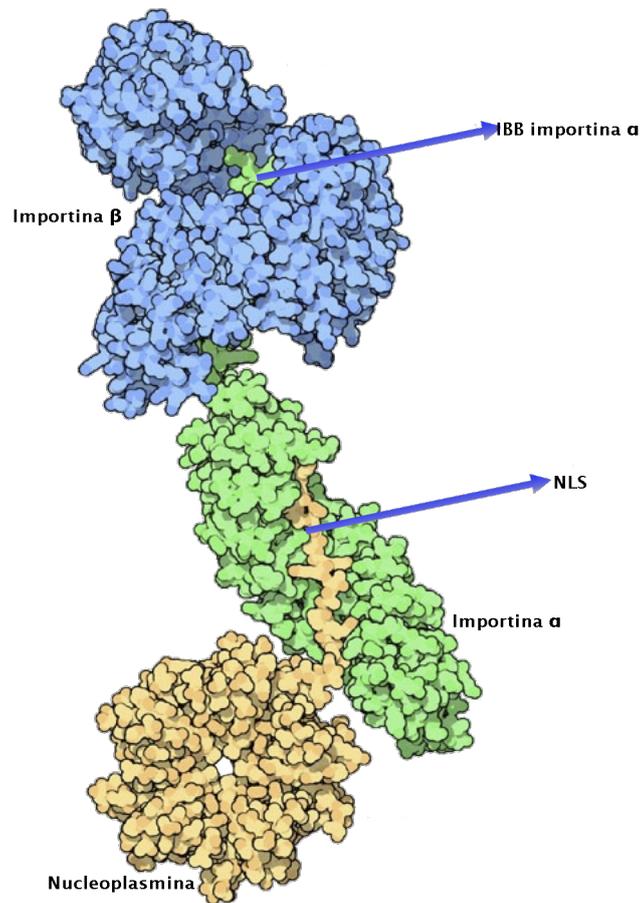


Figura 1.7: Struttura del complesso importina- α , importina- β e proteina cargo.

nel nucleo). Dopo che il cargo è stato rilasciato nel nucleo, l'importina- α e β devono tornare nel citoplasma ed essere disponibili per nuovi cicli di import.

1.2.2.1 Il modello di trasporto dipendente da Ran

L'ipotesi del ruolo fondante di Ran nell'import nucleare è stata costruita inizialmente su due fatti rilevati da esperimenti *in vitro* e *vivo* [37]. 1) Le mutazioni a carico di Ran provocavano un'alterazione dell'import nucleare in vivo e 2) Ran è stata individuata come componente citoplasmatica richiesta per il trafficking dei substrati contenenti NLS attraverso la membrana nucleare in vitro (Fig. 1.8). Come molte altre GTPasi, Ran idrolizza il GTP molto lentamente e quindi la cinetica di idrolisi è regolata dall'intera-

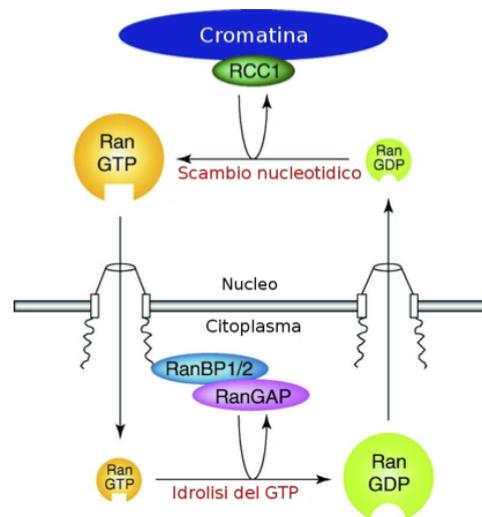


Figura 1.8: La localizzazione specifica di RanGAP e di RCC1 (RanGEF) determinano la formazione di un gradiente di Ran. Adattato da Kuersten et al, 2001. [38].

zione con diverse altre proteine, tra cui la proteina attivatrice di Ran (RanGAP1), la proteina attivatrice di RanGAP (RanBP1), il fattore di scambio guanosinico (RanGEF) e la proteina che attiva la RanGEF, ovvero RanBP3. RanGAP1 amplifica l'attività GTPasica di Ran di circa 10.000 volte e in presenza di RanBP1 di circa 100.000 volte. RanGAP1 si trova solo nel citoplasma o, dopo sumoilazione (ovvero dopo la formazione del coniugato con la proteina SUMO-1), si può trovare legata alla nucleoporina Nup358, detta anche RanBP2, localizzata sulle fibrille della parte citoplasmatica del NPC. RanBP1 passa tra il citoplasma e il nucleo ma è localizzata preferenzialmente nel citoplasma, mentre RanGEF (anche chiamata RCC1), che ricostituisce il pool di RanGTP, è localizzata esclusivamente nel nucleo, complessata con le subunità istoniche H2A e H2B. RanGEF accelera lo scambio $\text{GDP} \rightarrow \text{GTP}$ su Ran di circa 10.000 volte. Come prima riportato, l'esatta localizzazione di RanGAP1 nel citoplasma e RanGEF nel nucleoplasma comporta la creazione di un gradiente tra i due versanti dell'Envelope, con RanGTP localizzato prevalentemente nel nucleo mentre il complesso con GDP nel citoplasma [38].

Il processo di import prosegue con l'interazione tra il complesso karioferina-

α / $-\beta$ /cargio NLS e RanGTP (presente in basse concentrazioni nel citoplasma) con la proteina RanBP2 (Nup358), che è una componente delle fibrille citoplasmatiche dell'NPC. RanBP2 contiene alcune ripetizioni FXFG e 4 domini di legame per Ran. E' risaputo che il dimero karioferina- α / $-\beta$ è instabile in presenza di RanGTP; conseguentemente, durante l'ancoraggio del complesso karioferina- α / $-\beta$ /NLS/RanGTP a RanBP2, una rapida idrolisi del GTP prende luogo. Come menzionato sopra, oltre al RanGAP1 solubile (deputato all'idrolisi del GTP) esiste la forma sumoilata complessata con RanBP2. Nella sua forma libera l'importina- β sopprime significativamente l'attività di RanGAP1, ma dopo l'interazione con RanBP2 l'effetto inibitorio dell'importina- β è ridotto, consentendo l'idrolisi del GTP e quindi la stabilizzazione del complesso (karioferina- α / $-\beta$ /NLS/RanGDP). Proprio grazie alla diversa stabilità del complesso in presenza di RanGDP e RanGTP, l'import prosegue in maniera direzionale spostandosi da una zona maggiormente concentrata in RanGDP (complesso stabile) ad una, il nucleo, in cui la concentrazione di RanGTP è più alta (complesso instabile). Tuttavia, nella fase iniziale del processo, sul versante citoplasmatico, il legame con RanGTP risulta fondamentale e solo a seguito di tale interazione avviene l'idrolisi del nucleotide trifosfato. Il pool minimo di RanGTP nel citoplasma è mantenuto da un fattore di trasporto Mog1p, che ha un'alta affinità per il Ran legante GTP e lo trasporta dal nucleo verso il citoplasma. Il complesso karioferina- α / $-\beta$ /NLS raggiunge il CGC dopo aver percorso circa 40 nm, probabilmente tramite l'interazione con le proteine che costituiscono le fibrille citoplasmatiche. Invece, per quanto riguarda l'attraversamento dei 30 nm che costituiscono la lunghezza del canale centrale CGC non si conoscono ancora i dettagli molecolari. Tuttavia, si può immaginare una generale sequenza di eventi: immediatamente dopo il rilascio dalle fibrille, il complesso lega la nucleoporina p62 e il fattore di trasporto NTF2 (*nuclear transport factor*). NTF2 è un piccolo omodimero che assicura un import unidirezionale del complesso di trasporto, favorendo le interazioni di quest'ultimo con le varie FG Nup che rivestono il CGC. Dopo l'attraversamento del Poro, il complesso lega Nup62 e infine viene ancorato alla nucleoporina Nup153, dove avviene il disassemblaggio. Questo avviene in tre passaggi: 1) Nup153, proteina del

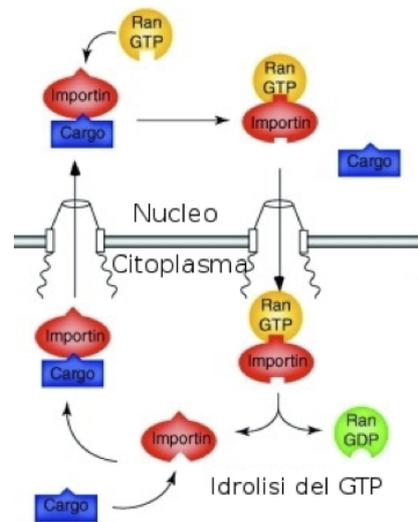


Figura 1.9: Rappresentazione schematica dei processi coinvolti nell'import nucleare delle proteine contenenti NLS. Adattato da Kuersten et al, 2001[38].

canestro nucleare, lega il complesso tramite interazione delle sue ripetizioni FG con l'importina- β . 2) RanGTP, la cui concentrazione nel nucleo è molto alta, lega il complesso di trasporto e causa il rilascio dell'importina- β dal dimero karioferina- α /cargo-NLS. 3) La dissociazione dell'importina- β diminuisce l'affinità dell'importina- α per l'NLS e come risultato si ha un rilascio nel nucleoplasma del cargo (Fig. 1.9).

1.2.3 Laminopatie e NPC. Evidenze sperimentali di alterazioni presenti in letteratura

Ci sono inequivocabili evidenze di un'esistente connessione tra la LN e gli NPC, emerse da studi ultrastrutturali e da esperimenti *in vivo* [39, 40]. Inoltre, le nucleoporine sono in grado di interagire in maniera diretta o indiretta con le lamine, in particolare modo sembra farlo Nup153, la cui localizzazione risulta essere particolarmente dipendente dall'integrità della LN [41]. È stato riportato che Nup153, che compone il canestro nucleare e l'anello nucleoplasmatico dell'NPC, interagisce tramite il suo dominio C-terminale con le lamine di tipo B e che la struttura rigida fornita dalla LN faccia sì che gli NPC siano strettamente ancorati ad essa [15] (Fig. 1.10). In assenza di

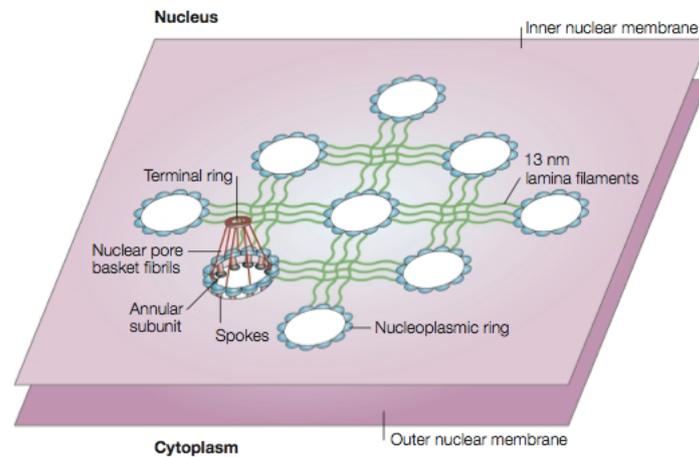


Figura 1.10: Secondo questo modello di interazione fra Nup153 e le lamine i filamenti della Lamina ortogonali fra loro interagiscono con l'anello proteico dell'NPC in cui è presente Nup153. Adattato da Hutchinson, 2002[15].

Nup153 [42] o bloccando l'espressione delle lamine [43], gli NPC risultano liberi di muoversi nella membrana nucleare con una tendenza a clusterizzare in regioni ad alta densità.

In un lavoro di Busch et al.[44] viene evidenziato come l'espressione delle lamine mutanti di tipo A in cellule HeLa trasfettate provochi un'alterata localizzazione di alcune nucleoporine aventi ruoli chiave nei vari pathway di trasporto nucleare. Lo studio è condotto utilizzando tecniche di immunoblotting e di imaging *in vivo* con costrutti di fusione tra proteine di interesse e proteine fluorescenti come GFP o DsRED. La nucleoporina Nup62 (messa in evidenza tramite anticorpo monoclonale) e il fattore di trasporto Crm1 fuso con la GFP (Crm1-GFP) - che svolge un ruolo importante nell'export nucleare e nel trasporto di RNA al di fuori del nucleo - mostrano una localizzazione alterata rispetto a cellule di controllo. Diverso è il caso di GFP-Nup153 che risulta essere ugualmente localizzata sia in cellule di controllo che in cellule trasfettate esprimenti la progerina. Nello studio sopra menzionato ipotizzano inoltre, alla luce di queste localizzazioni anomale delle proteine del NPC, che il trasporto nucleo-citoplasmatico possa essere in qualche modo alterato nelle cellule esprimenti le varianti mutate di lamina A. Utilizzando diversi costrutti di fusione delle proteine GFP con varie tipologie di NLS (tra cui

la forma “canonica” di NLS riconosciuta dal complesso importina- α / $-\beta$), che danno specificità per quanto riguarda il riconoscimento della proteina cargo da parte di diverse karioferine, è stato rivelato che per quanto riguarda, ad esempio, NLS-GFP canonica, l’accumulo nucleare in cellule cotrasfettate con progerina risultava ridotto del 30% rispetto a quanto si può misurare in cellule sane, lasciando intendere un effettivo coinvolgimento del network di trasporto via NPC nella malattia.

In un altro studio [45] viene messa in evidenza, tramite immunofluorescenza, la localizzazione di alcune nucleoporine come Nup153 e Nup414 in cellule HGPS, che risulta non alterata in cellule a pochi passaggi in coltura, ma risulta alterata nei passaggi colturali più tardivi. Sembrerebbe anche che numerosi lunghi settori di Envelope siano privi di Pori, specialmente nelle lobature che compaiono nei nuclei di cellule esprimenti la progerina.

L’ultimo studio qui riportato [46] ha evidenziato come la forma mutata della lamina A espressa in cellule di pazienti affetti da HGPS alteri il sistema della GTPasi Ran. L’osservazione fondante è che il rapporto tra la concentrazione nucleare e citoplasmatica (*N/C ratio*) di Ran è ridotta nei fibroblasti di pazienti affetti da progeria, un effetto causato dalla progerina stessa e non semplicemente dipendente dal numero di passaggi della coltura cellulare, come confermato da osservazioni su cellule HeLa trasfettate. Ran dovrebbe avere una predominante localizzazione nucleare, ma in fibroblasti HGPS c’è una netta riduzione nei livelli di Ran nucleare e un aumento dei livelli citoplasmatici. In cellule HGPS dove la distribuzione di Ran è alterata, il pattern di localizzazione varia da cellule dove la concentrazione di Ran appare in equilibrio tra nucleo e citoplasma e cellule dove c’è un gradiente inverso N/C di Ran. Questo, tra l’altro, costituisce l’unico esempio noto in cui una patologia altera il gradiente di Ran. Inoltre, I livelli nucleari di Ubc9 – enzima chiave nel processo di sumoilazione delle proteine - sono significativamente ridotti dall’espressione della progerina, suggerendo che la progerina inibisca l’import nel nucleo di Ubc9. La mancata presenza di Ubc9 nel nucleo sembra correlata con la scomparsa del gradiente di Ran, in quanto il ripristino nel gradiente provoca anche la rilocalizzazione corretta di Ubc9. Pare però che sia la mislocalizzazione di Ubc9 a causare la scomparsa del gradiente

di Ran e non viceversa: l'effetto dell'assenza di Ubc9 nel nucleo comporta una riduzione nella sumoilazione di altre proteine, provocando anche una riduzione della funzione di RCC1, la GEF di Ran, e come conseguenza la presenza di RanGTP nel nucleo decresce. Tuttavia, studi effettuati con costrutti di 400 kDa per valutare il trasporto attivo tramite import mediato da importina- β sembrerebbero confermare che il trasporto attivo non risenta della scomparsa del gradiente di Ran. Il saggio per valutare l'import è basato sulla microiniezione di una proteina cargo fluorescente che contiene un dominio di legame per l'importina- β (IBB, presente nell'importina- α), fuso a β -Gal (IBB- β -Gal) e marcato con il fluoroforo Alexa Fluor 555. A causa della massa molecolare del tetramero IBB- β -Gal-AF (400 kDa) che è ben al disopra del limite di diffusione del NPC, la localizzazione nucleare del complesso è strettamente dipendente dal legame con l'importina- β e dalla sua traslocazione attraverso il nucleo. Solo ad alte concentrazioni di IBB- β -Gal impiegate nel saggio si registra una lieve diminuzione dell'import, lasciando intendere che, nonostante il gradiente di Ran appaia perturbato, il trasporto attivo verso il nucleo non ne risenta.

L'import nucleare di TPR appare invece alterato in cellule HGPS, forse per la sua maggior sensibilità al gradiente Ran. TPR modula multipli *pathway* nucleari, incluso quelli per la regolazione posttrascrizionali dei geni, facendo pensare che l'assenza di TPR dall'NPC possa contribuire ad alcuni cambiamenti nell'espressione genica associati all'HGPS.

1.3 Tecniche biofisiche applicate a domande biologiche

Quando si parla di biofisica si deve intendere l'applicazione di teorie, tecniche e strumentazione mutuata dalle scienze fisiche per lo studio e la comprensione di numerosi aspetti biologici. Lo sviluppo che ha avuto questa disciplina negli ultimi anni è andato di pari passo con quello di alcune tecnologie quali il microscopio elettronico, la tomografia PET, la risonanza magnetica nucleare, il microscopio a forza atomica e il microscopio confocale. Se tecniche quali la tomografia ad emissione di positroni, la risonanza magnetica, la tomo-

grafia ottica a coerenza di fase, permettono di fare *imaging* in tempo reale su animali o soggetti umani, hanno però un limite di risoluzione spaziale piuttosto elevato, che non permette di discriminare dettagli più piccoli di 1mm, 100nm e 10nm, rispettivamente. La microscopia elettronica presenta il problema opposto: consente una risoluzione spaziale su scala molecolare ma le cellule devono essere fissate, processo invasivo e che impedisce l'*imaging* dinamico. Tra questi due estremi di risoluzione, la microscopia a fluorescenza coniuga un ampio range di risoluzione spaziale e temporale con la compatibilità con cellule *in vivo*. Inoltre, i recenti progressi nelle tecniche di *imaging*, potenziate dallo sviluppo di sonde fluorescenti multifunzionali (alcune delle quali sono codificabili geneticamente), hanno reso possibile una visualizzazione *real-time* di biomolecole su scala inferiore ai 100 nm [47]. Il microscopio confocale, in particolare, è applicato in combinazione con una numerosa varietà di tecniche volte alla determinazione quantitativa piuttosto che qualitativa di diversi problemi biologici, quali la determinazione di parametri cinetici per quanto riguarda singole biomolecole o interazioni intra- e inter-molecolari. Tra le tecniche che prevedono l'utilizzo della microscopia confocale c'è la FRAP, mediante la quale è possibile eseguire studi di *imaging in vivo* tramite l'utilizzo di fluorofori, particolarmente indicata per lo studio della cinetica di internalizzazione nei vari compartimenti subcellulari, quali, ad esempio, il nucleo.

1.3.1 *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) accoppiata a sonde fluorescenti codificabili geneticamente

La FRAP[48], acronimo di *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, nasce intorno alla metà degli anni '70 come tecnica utile per effettuare studi sulla mobilità di molecole sia in vivo che in diversi altri mezzi. Originariamente, la tecnica è stata quindi utilizzata come metodo per misurare la diffusione in membrane cellulari usando diversi fluorofori organici come la fluoresceina, ma proprio in virtù della sua versatilità lo sviluppo della tecnica l'ha resa negli anni un ottimo strumento per indagare molti altri aspetti

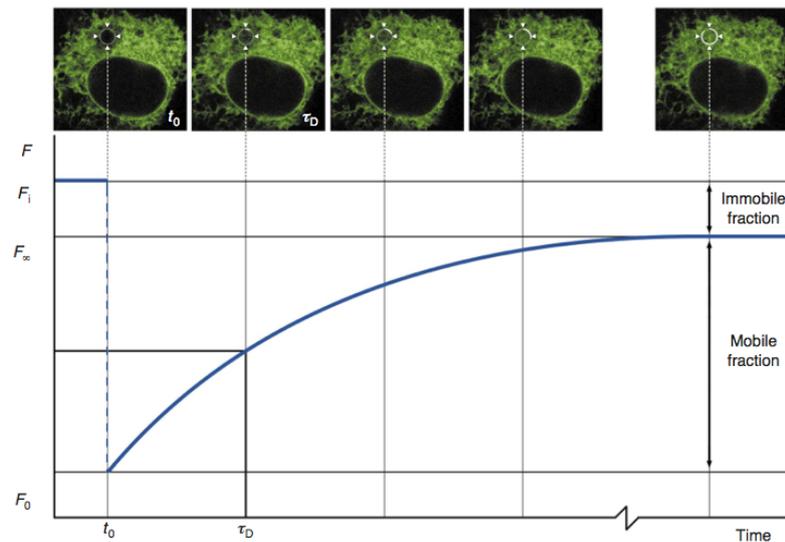


Figura 1.11: Viene qui rappresentata una tipica curva di recupero ottenuta da un esperimento FRAP. F_i indica la fluorescenza prima del *photobleaching*; F_0 indica la fluorescenza residua in seguito al *photobleaching* (effettuato al tempo t_0); F_∞ indica il valore asintotico della fluorescenza; τ_D rappresenta il valore della costante di recupero. Adattato da Reits e Neefjes, 2001.

della biologia cellulare, inclusa la dinamica del citoscheletro [49], il trasporto vescicolare [50], la struttura della cromatina [51] e le vie di trasduzione del segnale [52]. In generale, la FRAP è stata utilizzata per investigare:

- Movimento e diffusione di proteine e molecole.
- Compartimentazione e connessione tra compartimenti intracellulari.
- La velocità di scambio di proteine e molecole tra compartimenti.
- Caratteristiche di legame tra proteine. Inoltre, è possibile valutare gli effetti di mutazioni che alterano l'associazione tra proteine e gli effetti di piccole molecole, come farmaci o inibitori, sull'accoppiamento delle proteine.
- Immobilizzazione di proteine che legano grandi strutture, come il DNA, l'EN, membrane, elementi del citoscheletro.

Strettamente associata alla microscopia a fluorescenza e alla microscopia confocale, si basa su un principio relativamente semplice, di seguito schematizzato:

1. Da una sorgente laser (generalmente) viene fatto partire un impulso indirizzato verso una regione del campione.
2. I fluorofori colpiti dalla radiazione subiscono il così detto *photobleaching*, che consiste in una trasformazione chimica associata a forte riduzione o totale spegnimento dell'emissione.
3. Dalle regioni prossime alla zona fotosbiancata le molecole fluorescenti si spostano, provocando un recupero della fluorescenza della zona precedentemente irraggiata. Monitorando tale recupero si possono poi desumere alcuni parametri relativi alla proteina o molecola di interesse (Fig. 1.11).

Il *photobleaching* consiste in una modificazione fotochimica in seguito alla quale il fluoroforo perde irreversibilmente la sua capacità di fluorescere. Non sono ancora chiari i meccanismi che lo provocano, ma nel caso più frequente si succedono questa serie di eventi: il fluoroforo colpito dal raggio laser passa dal suo stato energetico fondamentale ad uno stato eccitato, detto stato di singoletto (S^*). A questo punto il fluoroforo dissipa parte dell'energia in moti vibrazionali; la parte di energia rimanente può essere riemessa sotto forma di fluorescenza, ovvero emissione di luce ad una lunghezza d'onda maggiore di quella con cui è stato colpito il fluoroforo, oppure il fluoroforo può utilizzare l'energia per effettuare una cosiddetta conversione intersistema, causata dall'accoppiamento spin orbita, e passare così ad uno altro stato eccitato, detto stato di tripletto (T^*). La molecola nello stato di tripletto è altamente reattiva e può andare incontro a modifiche covalenti che causano la perdita della capacità di fluorescere. In particolare, la reazione con ossigeno molecolare che provoca la formazione di radicali superossido e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono in grado di provocare modifiche covalenti sul fluoroforo (Fig. 1.12).

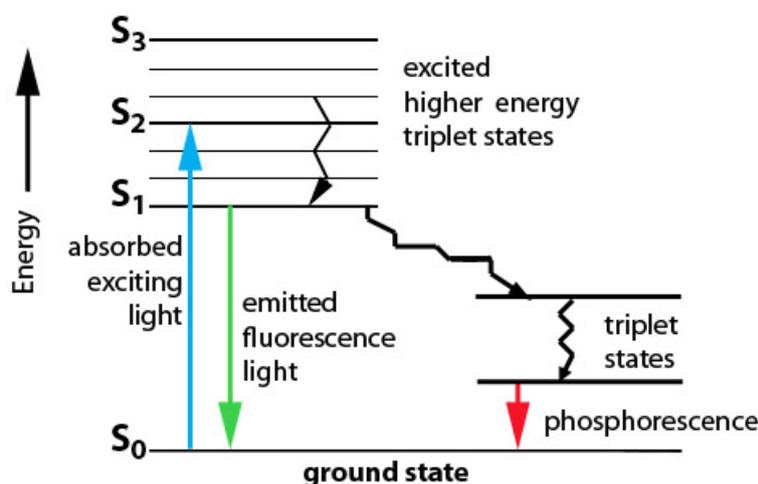


Figura 1.12: A seguito dell'assorbimento di energia la molecola raggiunge lo stato di singoletto eccitato S^* si assiste prima a un decadimento non radiativo poi ad una transizione radiativa dallo stato vibrazionale fondamentale dello stato elettronico superiore. Dallo stato di singoletto S^* la molecola può passare anche a quello di tripletto T^* in seguito ad una conversione intersistema: in questo stato le molecole possono emettere lentamente dando luogo al fenomeno della fluorescenza

Di per sé la FRAP risulta abbastanza semplice da eseguire, ma la trattazione matematica necessaria per estrapolare una corretta informazione quantitativa sul processo studiato tramite la tecnica, nella fattispecie il trasporto nucleocitoplasmatico, risulta al contrario estremamente complessa e ampiamente trattata in letteratura[53, 54]. Alla FRAP risulta quindi necessario associare un qualche tipo di fluoroforo, bersaglio del bleaching indotto dall'impulso laser; a tale riguardo la proteina fluorescente verde, meglio nota come GFP[55], assolve in maniera ottimale questo compito. Isolata pochi anni prima della messa a punto della FRAP dalla medusa *Aequorea Victoria*, la GFP è una proteina di massa pari a 27 kDa costituita da 238 amminoacidi organizzati in una caratteristica struttura secondaria a β -barile, costituita da 11 foglietti β . All'interno di tale struttura è confinato e protetto dalle variazioni ambientali il cromoforo vero e proprio, costituito da soli tre amminoacidi Ser65, Tyr66, Gly67, che si organizzano in una piccola α -elica (Fig. 1.13).

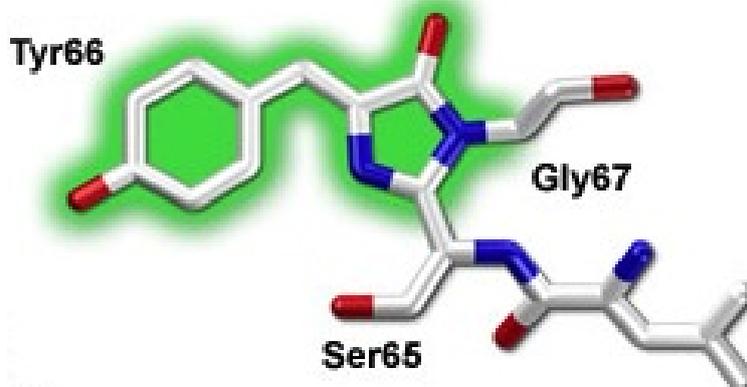


Figura 1.13: Cromoforo della GFP

Il *photobleaching* di questa proteina non causa danni rilevabili alla cellula. Questo ci permette inoltre di sottolineare un altro aspetto che rende la FRAP così importante e adatta a questo tipo di studi, ovvero il fatto che il fenomeno del *photobleaching* interessa esclusivamente le proprietà ottiche del fluoroforo e dunque non intervenga in alcun modo sulla biochimica della proteina target.

Al termine dell'esperimento, mediante un'analisi quantitativa della curva di recupero della fluorescenza è possibile determinare importanti parametri della molecola o della proteina in esame, quali la frazione immobile (I_f) e il coefficiente di diffusione D . Tali parametri possono fornirci informazioni utili relativamente all'ambiente cellulare, alla viscosità del mezzo, alla eventuale presenza di trasporto attivo o, ancora, l'eventuale partecipazione della proteina target nella formazione di aggregati immobili o sulla sua eventuale esatta localizzazione in un determinato compartimento.

La GFP impiegata nello studio riportato in questa tesi non è la GFP *wild type* di *A. victoria* ma una sua variante, chiamata EGFP (la E sta per *Enhanced*) che presenta due modificazioni amminoacidiche – F64L, S65T – le quali si riflettono in un cambiamento nelle proprietà spettroscopiche della proteina: se la forma *wt* presenta due picchi di eccitazione, uno a 395 nm con un relativo picco di emissione a 508 nm e un secondo a 475 nm con picco di emissione a 503 nm, la EGFP presenta un solo picco di eccitazione intorno ai 489-490 nm con relativa emissione aumentata di 5 o 6 volte rispetto alla

wt. Ma a fare della GFP la proteina di elezione negli studi di *imaging in vivo* sono molte altre caratteristiche quali 1) la sua elevata resa quantica rispetto ad altri cromofori 2) la possibilità di effettuare studi per tempi lunghi data la sua particolare struttura terziaria che protegge il cromoforo da agenti esterni e 3) il fatto che essa interferisca scarsamente con le normali attività cellulari e che questo la renda particolarmente indicata nella creazione di costrutti di fusione in cui la GFP, o le sue varianti, sono fuse in frame con altre proteine di interesse di cui si vuole studiarne in primo luogo la localizzazione e dinamica.

1.4 Scopo di questo lavoro di tesi

Dopo una breve disamina sulle principali componenti proteico-strutturali che definiscono la compartimentazione nucleare e regolano il trasporto da e verso questo compartimento, risulterà utile riportare schematicamente quelle che sono le evidenze sperimentali, già per altro esposte nelle varie sezioni di questo capitolo, di alterazioni nei fenomeni fisiologici correlati alla funzione strutturale e funzionale della LN in presenza di laminopatie, quali la grave Sindrome di Hutchinson-Gilford:

- Per quanto riguarda le alterazioni della morfologia nucleare le evidenze a supporto sono molte, anche con numerosi dettagli ultrastrutturali e studi sulle proprietà micromeccaniche della cellula sottoposta a stress.
- Ci sono inoltre diversi studi che rivelano come la LN svolga un ruolo primario nell'organizzazione dell'etercromatina periferica e quindi dell'espressione genica, e che dunque un'alterazione nel suo assemblamento, come avviene nella Progeria, possa portare ad una espressione differenziale di alcuni geni tra cui fattori di trascrizione, con conseguente effetto a cascata su altri trascritti e sul fenotipo della cellula e poi del tessuto di cui essa fa parte.
- La Lamina inoltre dà vita ad un telaio proteico su cui molte proteine che svolgono un ruolo di mediatore tra gli istoni della cromatina si ancorano. Anche gli NPC risultano tenuti in sede da interazioni sussistenti tra alcune delle nucleoporine, quali Nup153, che compongono il

core centrale del Complesso e le lamine. In cellule HGPS sono state più volte evidenziati dei difetti nella localizzazione di alcune nucleoporine e di altre proteine aventi ruoli di primo piano nel trasporto da e verso il nucleo. In presenza di aberrazioni nella struttura della Lamina, inoltre, gli NPC appaiono concentrati in regioni ad alta densità.

Poco è noto, però, sui possibili effetti che l'espressione e l'accumulo di progerina sulla LN possano esercitare sul *trafficking* nucleocitoplasmatico attraverso i Complessi del Poro, alla luce di quanto sopra esposto. L'utilizzo di costrutti cotrasfettati transientemente su cellule umane U2OS ha permesso 1) in primo luogo di creare un modello cellulare per la Progeria, grazie all'espressione della forma mutante della prelamina A fusa con la proteina fluorescente DsRed e 2) di studiare la cinetica del trasporto di biomolecole cargo quali NLS-EGFP e EGFP tramite la tecnica biofisica della FRAP, per valutare sia l'import attivo mediato dalle karioferine sia l'import prettamente passivo, garantito dalle dimensioni ridotte della EGFP (27kDa) tali da consentirgli una libera diffusione attraverso gli NPC.

2.1 Vettori plasmidici

Alcuni vettori plasmidici utilizzati negli esperimenti di seguito descritti in questa tesi sono stati gentilmente forniti da Albert Busch dell'Università di Wurzburg (Germania) [44]. In particolare si fa riferimento ai plasmidi esprimenti la forma *wt* della lamina A in frame con la proteina fluorescente DsRed, da qui in poi denominata DsRed-LaA e la progerina fusa anch'essa con una proteina DsRed, da qui in poi denominata DsRed-HGPS.

La DsRed è una proteina tetramerică che emette una fluorescenza nel rosso. Ha un picco di eccitazione a 558 nm e un picco d'emissione intorno ai 583 nm. Un particolare degno di nota di questa proteina è la sua lenta maturazione: una delle forme intermedie del processo di maturazione possiede un picco di emissione nel verde, del tutto simile a quello della GFP; per questo motivo le misure al microscopio confocale sono state eseguite 48 ore dopo la trasfezione.

Per i due plasmidi precedentemente menzionati è stato necessario effettuare un'amplificazione in cellule batteriche al fine di ottenerne in quantità adeguate per le trasfezioni. A tal proposito le cellule batteriche *One Shot Top10 Chemically Competent E. coli*, della Invitrogen sono state trasformate

con il classico protocollo di shock termico a 42°C per 45 secondi. Secondo le specifiche forniteci dal laboratorio di Busch, il plasmide contenete DsRed-LaA presentava anche un marcatore di selezione per la resistenza all'antibiotico Ampicillina, mentre l'altro, col costruito DsRed-HGPS, presentava un gene per la resistenza alla Kanamicina. La selezione delle cellule batteriche correttamente trasformate è stata quindi effettuata piastrando i batteri su piastre Petri con agar addizionato ai rispettivi antibiotici. Ottenute le colonie resistenti, una di esse è stata inoculata in terreno liquido, lasciata crescere *overnight* e da queste è stato poi estratto il DNA plasmidico tramite il kit *Plasmid Plus Maxi Kit* della Qiagen.

Altri vettori plasmidici impiegati negli esperimenti di FRAP sono quelli contenenti l'inserito NLS-EGFP - con il "canonico" NLS del virus SV40 con sequenza PKKKRKV e riconosciuto dall'importina- α - e l'inserito con la sola EGFP, utilizzati in cotrasfezioni con i costrutti prima menzionati. Tali vettori erano già disponibili all'interno del laboratorio in aliquote contenenti DNA plasmidico concentrato 1 μ g/mL

2.2 Colture cellulari e trasfezioni

Lo studio della traslocazione nucleocitoplasmatica è stato effettuato su cellule umane U2OS [56], linea immortalizzata di cellule estratte da un osteosarcoma. Sono state cresciute in medium DMEM addizionato con il 10% di FBS (*Fetal Bovine Serum*) e antibiotici Penicillina e Streptomicina (Pen/Strep); mantenute in incubatore ad una temperatura di 37°C con CO₂ al 5%. Per gli esperimenti di imaging *in vivo*, circa 24 ore prima della trasfezione viene piastrata un'aliquota di 200 μ L di cellule provenienti da piastre P100 per colture cellulari all'80% di confluenza su piastre di 35-mm a fondo di vetro (WillCo-dish GWSt-3522). Il protocollo standard per la trasfezione prevede la preparazione di due eppendorf da 1,5mL, in ciascuna delle quali vengono aggiunti 100 μ L di terreno DMEM privo di FBS e di antibiotici. In una delle due eppendorf della coppia viene aggiunto 1,4 μ g di DNA plasmidico, mentre nell'altra viene aggiunto 3,7 μ L di *Lipofectamine* (Invitrogen, Carlsbad, CA) secondo le istruzioni previste dal protocollo fornito dalla casa produttrice.

Dopo una prima attesa di cinque minuti, il contenuto della eppendorf contenente la *Lipofectamine* viene fatto "gocciolare" nella eppendorf contenente il DNA plasmidico, sottoposta ad agitazione manuale. Segue un'attesa di venti minuti durante la quale è opportuno preparare le cellule alla trasfezione. Dalla WillCo preparata il giorno precedente viene aspirato il terreno di coltura - lavata per due volte con PBS1X (~1mL) - e sostituito con 800 μ L di terreno DMEM senza siero e senza antibiotici. Al termine dei venti minuti il contenuto della eppendorf (a questo punto di ~200 μ L) viene colato nella WillCO e lasciato agire per tre ore. Al termine di questo terzo tempo di attesa, il mezzo di coltura presente nelle WillCo viene nuovamente rimosso e sostituito con terreno DMEM completo (questa volta, quindi, contenente FBS e Pen/Strep). Per quanto riguarda la cotrasfezione di due distinti DNA plasmidici, l'unica modifica prevista nel protocollo prima descritto riguarda la quantità di DNA plasmidico da aggiungere alla eppendorf che deve essere equamente divisa in 0,7 μ g per il primo costrutto e 0,7 μ g per il secondo.

Seguendo il disegno sperimentale schematizzato in Tabella 2.1 è stato possibile ottenere un modello cellulare per la Progeria su cui studiare il trasporto nucleocitoplasmatico tramite FRAP. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli riferiti alla cotrasfezione della forma *wt* della Lamina A fusa con DsRed (DsRed-LaA) con le proteine cargo fluorescenti (NLS-EGFP) riconosciute dal meccanismo di import mediato dall'importina- α , in modo da mettere in luce eventuali variazioni dell'import nucleare nelle due condizioni sperimentali.

Le misure FRAP al microscopio confocale sono state eseguite 48 ore dopo circa l'avvenuta trasfezione.

2.3 Microscopia a fluorescenza ed analisi delle immagini

Per tutti gli esperimenti è stato utilizzato un microscopio confocale invertito Leica TCS SP2 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germania) (Fig. 2.1), dotato di due laser: un laser HeNe per l'eccitazione a 543nm e a 633nm e uno ad Argon, in grado di eccitare a 458, 476, 488 e 514nm. Le WillCo contenenti le cellule trasfettate sono state posizionate in una camera termo-

Tabella 2.1: Disegno sperimentale

Disegno sperimentale		
	NLS-EGFP	EGFP
DsRed-LaA	Studio del trasporto attivo e passivo.	Studio della diffusione passiva.
DsRed-HGPS	Studio del trasporto attivo e passivo in modello cellulare per la Progeria.	Studio della diffusione passiva in modello cellulare per la Progeria.

stata (Leica Microsystems) a 37°C in grado di fornire anche un ambiente con pressione parziale di CO₂ pari al 5%. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata eccitando con il laser il campione ad una potenza compresa tra 5 e 70μW. L'emissione invece è stata raccolta tramite un detector AOBS (*Acousto-Optical Beam Splitter*) installato nel microscopio. Per la visualizzazione delle proteine DsRed-LaA e DsRed-HGPS è stato impiegato un laser esterno in grado di eccitare alla lunghezza d'onda di 561nm; la raccolta delle immagini è stata invece effettuata adottando un intervallo di emissione tra i 600 e i 700nm.

Tutte le immagini raccolte negli esperimenti sono state analizzate tramite software libero ImageJ (NIH) versione 1.47 e successivamente tramite un'implementazione del software Igor Pro (WaveMetrics), versione 5, per lo studio dei parametri cinetici desumibili dalle misurazioni FRAP.



Figura 2.1: Microscopio confocale Leica SP2

2.4 Esperimenti FRAP sulla traslocazione citoplasma/nucleo

Una volta individuata una cellula correttamente cotrasfettata, per ciascun esperimento è stata inizialmente acquisita un'immagine della cellula in studio, il *pre-bleaching* (4 medie in linea); successivamente veniva indotto il photobleaching (*single-point bleaching*) inviando il laser alla massima potenza (100% corrispondente a $\sim 150\mu\text{W}$ di potenza in uscita dall'obiettivo) in prossimità del centro del nucleo per un tempo sufficiente ad ottenere il *bleaching* completo di tutto il compartimento nucleare, ovvero 8-10s. Il successivo monitoraggio del recupero della fluorescenza, secondo le premesse teoriche della FRAP (vedere paragrafo 1.3.1), inizia pochi millisecondi dopo il termine del *photobleaching* e prosegue con un campionamento di 20 immagini (*frame*) ogni 20s, eccitando con laser a $\sim 25\mu\text{W}$ in uscita dall'obiettivo. Ciascuna acquisizione è stata effettuata utilizzando un obiettivo 40X ad immersione ad olio, con un'apertura numerica di 1,25 e un'apertura del *pinhole* pari a 1 Airy (corrispondente a $81,44\mu\text{m}$ di apertura confocale). Per l'eccitazione della EGFP (con e senza NLS) è stato utilizzato il laser ad Argon, alla lunghezza d'onda di 488 nm; la raccolta delle immagini è stata invece

effettuata in un intervallo tra i 500 e i 600nm.

Ogni curva di recupero (esemplificata in Fig. 1.11) è stata fittata con la seguente equazione mono-esponenziale, in accordo col modello matematico adottato per l'interpretazione quantitativa del processo di import nucleare:

$$F(t) = F^\infty + (F^0 - F^\infty) \cdot \exp(-t/\tau_F) \quad (2.1)$$

Dove F^∞ rappresenta il valore asintotico della fluorescenza, F^0 rappresenta il valore della fluorescenza al tempo $t = 0$ e τ_F rappresenta il valore della costante di recupero.

2.5 Determinazione dei parametri di trasporto

Al fine di calcolare i principali parametri cinetici di import nucleare, ovvero $\Phi_{C \rightarrow N}$ il flusso attivo in eccesso della molecola cargo dal citoplasma verso il nucleo, P_N , ovvero la permeabilità della membrana nucleare e τ_F , la costante di recupero, occorre prima determinare alcuni altri parametri ottenibili dall'analisi dell'immagine acquisita *pre-bleaching* tramite i *plugin* disponibili del software libero Imagej. Per una ulteriore e più dettagliata trattazione del modello matematico e del significato dei parametri prima menzionati si rimanda al Capitolo 3.

Si definisce K_{eq} il rapporto tra la concentrazione di NLS-EFGP tra nucleo e citoplasma nell'immagine acquisita *pre-bleaching*:

$$K_{eq} = \frac{F_N^0}{F_C^0} \quad (2.2)$$

L'altro parametro da determinare è il volume del nucleo (V_N), calcolato assumendo che esso abbia una forma ellissoide, ovvero misurando la lunghezza dei semiassi d_x , d_y e d_z dall'immagine *prebleaching* ottenuta con il microscopio confocale. Tramite la formula:

$$V_N = 4/3 \cdot \pi d_x \cdot d_y \cdot d_z \quad (2.3)$$

viene calcolato il volume del nucleo, assumendo però che d_z sia uguale a d_y , il semiasse più corto nel piano orizzontale.

3.1 Modello dinamico per la traslocazione nucleocitoplasmatica

La dinamica del trasporto nucleocitoplasmatico, nelle sue componenti di diffusione passiva e di trasporto attivo, può essere descritta mediante un semplice modello matematico[57]. Di seguito saranno illustrati gli aspetti principali di tale modello, che prevede però alcune assunzioni preliminari:

- I due meccanismi di trasporto, diffusione e trasporto attivo, sono da considerarsi indipendenti l'uno dall'altro [58];
- La diffusione intra-compartimento avviene su una scala temporale molto più piccola di quella inter-compartimento;
- Ogni processo coinvolto viene considerato allo stato stazionario;
- L'analisi FRAP non incide in alcun modo sul processo studiato;
- Non ci sono cambiamenti di concentrazione delle specie studiate poiché i tempi della traduzione e del *folding* proteico sono molto più lunghi di quelli di un esperimento FRAP.

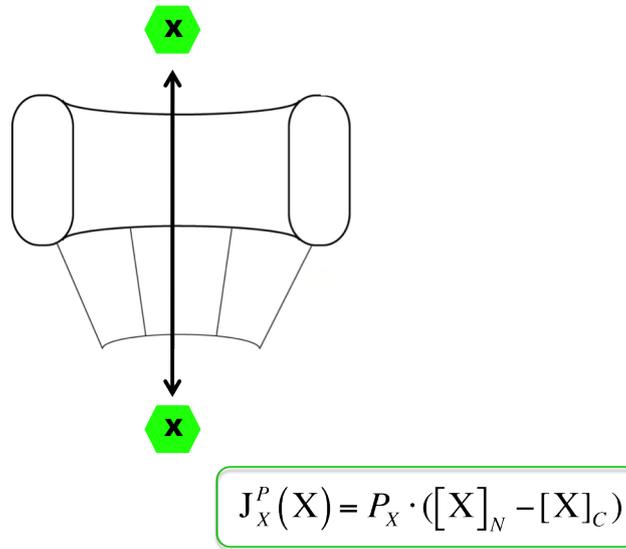


Figura 3.1: Schema della diffusione passiva

3.1.1 La diffusione passiva

Il meccanismo di diffusione passiva può essere descritto da una espansione della legge di Fick [59], adattata alle molecole che attraversano una membrana; si ottiene la seguente relazione empirica (per una generica molecola X):

$$J_x^p = P_x \cdot ([X]_N - [X]_C) \quad (3.1)$$

J_x^p rappresenta la velocità di diffusione passiva della molecola X, espressa in mol/s , positiva dal citoplasma al nucleo e negativa in caso opposto. Risulta proporzionale alla differenza di concentrazione della molecola cargo emissiva tra citoplasma e nucleo e a P_x , il coefficiente di permeabilità passiva del Envelope Nucleare, indipendente dalla concentrazione della molecola cargo X, definito come: $P_x = \frac{N_p A_p D_x}{\bar{L}} \cdot f(r_x, r_p)$ (Figura 3.1).

- N_p rappresenta il numero totale di pori presenti sulla membrana,
- A_p l'area geometrica dei pori,
- \bar{L} rappresenta la lunghezza media dei pori che attraversano la membrana,

3.1 Modello dinamico per la traslocazione nucleocitoplasmatica 43

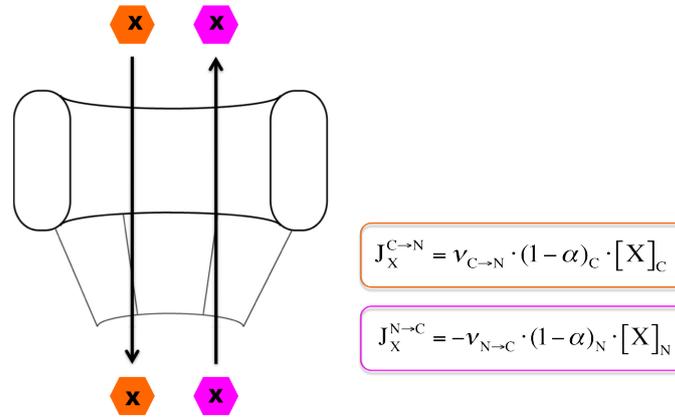


Figura 3.2: Schema del trasporto attivo $C \rightarrow N$ e $N \rightarrow C$

- D_x rappresenta la costante di diffusione della molecola X ,
- $f(r_x, r_p)$ rappresenta un fattore empirico, funzione polinomiale di X e del raggio del poro, che tiene conto della viscosità e dell'impedimento sterico dovuti al poro stesso.

3.1.2 Il trasporto attivo

Il trasporto attivo invece viene studiato suddividendolo in due distinte componenti, di cui si considera la velocità: la componente di trasporto dal citoplasma al nucleo $J_x^{C \rightarrow N}$ (positiva, mediata da importine) e una dal nucleo al citoplasma $J_x^{N \rightarrow C}$ (negativa, mediata da esportine):

$$J_x^{C \rightarrow N} = v_{C \rightarrow N} \cdot (1 - \alpha)_C \cdot [X]_C \quad (3.2)$$

$$J_x^{N \rightarrow C} = -v_{N \rightarrow C} \cdot (1 - \alpha)_N \cdot [X]_N \quad (3.3)$$

$\alpha_{C/N}$, indica la frazione molare di molecole X non impegnate in complessi con le proteine del trasporto nucleocitoplasmatico e di conseguenza $(1 - \alpha)_C$ e $(1 - \alpha)_N$ rappresentano la frazione molare della molecola X legata al macchinario di trasporto nel rispettivo compartimento. Infine $v_{C \rightarrow N}$ e $v_{N \rightarrow C}$ rappresentano le costanti cinetiche del trasporto mediato da importine o esportine (rispettivamente). L'ultimo termine rappresenta la concentrazione

3.1 Modello dinamico per la traslocazione nucleocitoplasmatica 44

(citoplasmatica o nucleoplasmatica) delle generiche molecole X fluorescenti (Figura 3.2).

3.1.3 Modello completo per la diffusione di molecole fluorescenti

Sommando le componenti di diffusione passiva e di trasporto attivo si ottiene un sistema di equazioni differenziali in cui le variabili sono rappresentate dalle concentrazioni della molecola X fluorescente in ciascun compartimento. (sia $N \rightarrow C$ che $C \rightarrow N$):

$$J_x = (J_x^P + J_x^{C \rightarrow N} - J_x^{N \rightarrow C}) = V_N \cdot \frac{d[X]_N}{dt} = -V_C \cdot \frac{d[X]_C}{dt} \quad (3.4)$$

da cui si arriva a:

$$\frac{d[X]_C}{dt} = \frac{-[P_x + k_x^{C \rightarrow N}] \cdot [X]_C + [P_x + k_x^{N \rightarrow C}] \cdot [X]_N}{V_C} \quad (3.5)$$

$$\frac{d[X]_N}{dt} = \frac{-[P_x + k_x^{C \rightarrow N}] \cdot [X]_C + [P_x + k_x^{N \rightarrow C}] \cdot [X]_N}{V_N} \quad (3.6)$$

dove i parametri $k_x^{C \rightarrow N} = (1 - \alpha)_C \cdot \nu_{C \rightarrow N}$, $k_x^{N \rightarrow C} = (1 - \alpha)_N \cdot \nu_{N \rightarrow C}$ hanno dimensione $\mu m^3/s$ e sono chiamati coefficienti di diffusione attiva, mentre V_N e V_C sono rispettivamente i volumi del nucleo e del citoplasma.

La soluzione del sistema lineare costituito dalle equazioni differenziali (3.5) e (3.6) è rappresentata da due funzioni monoesponeziali:

$$[X]_C(t) = [X]_C^\infty + ([X]_C^0 - [X]_C^\infty) \cdot \exp(-t/\tau) \quad (3.7)$$

$$[X]_N(t) = [X]_N^\infty + ([X]_N^0 - [X]_N^\infty) \cdot \exp(-t/\tau) \quad (3.8)$$

Dove τ è la costante di recupero della concentrazione e $[X]_N^\infty$ e $[X]_C^\infty$ rappresentano la concentrazione della molecola X nel nucleoplasma e nel citoplasma all'equilibrio.

Riprendendo la definizione di K_{eq} data nel paragrafo 2.5, ovvero il rapporto tra la concentrazione nucleoplasmatica di X e di quella citoplasmatica all'equilibrio, è facile poi dimostrare [57]:

3.1 Modello dinamico per la traslocazione nucleocitoplasmatica 45

$$K_{eq} = \frac{P_x + k_x^{C \rightarrow N}}{P_x + k_x^{N \rightarrow C}} \quad (3.9)$$

$$\frac{[X]_C^0 - [X]_C^\infty}{[X]_N^0 - [X]_N^\infty} = -\frac{V_N}{V_C} \quad (3.10)$$

$$\frac{1}{\tau} = \left(\frac{K_{eq}}{V_C} + \frac{1}{V_N} \right) \cdot [P_x + k_x^{N \rightarrow C}] \quad (3.11)$$

In un esperimento FRAP è possibile assumere che esista una proporzionalità diretta tra la concentrazione della molecola X e la sua fluorescenza, per cui nelle equazioni (3.7), (3.8) e (3.10) $[X]$ può essere sostituita con F, avente il significato di conteggi di fluorescenza rilevati:

$$F_C(t) = F_C^\infty + (F_C^0 - F_C^\infty) \cdot \exp(-t/\tau) \quad (3.12)$$

$$F_N(t) = F_N^\infty + (F_N^0 - F_N^\infty) \cdot \exp(-t/\tau) \quad (3.13)$$

$$\frac{F_C^0 - F_C^\infty}{F_N^0 - F_N^\infty} = -\frac{V_N}{V_C} \quad (3.14)$$

e $K_{eq} = \frac{F_N^\infty}{F_C^\infty}$

I dati di recupero della fluorescenza ottenuti da un esperimento FRAP sono fittati con (3.12) e (3.13), consentendo così di determinare i valori di K_{eq} , τ e il rapporto tra i volumi $\frac{V_N}{V_C}$. Uno dei due volumi (tipicamente V_N) può essere determinato dall'immagine ottenuta al microscopio confocale della cellula e calcolato con la (2.3) descritta nel paragrafo 2.5.

L'equazioni (3.9) e (3.11) permettono di separare le due somme $[P_X + k_x^{C \rightarrow N}]$ e $[P_X + k_x^{N \rightarrow C}]$. Si può dunque procedere separando i due contributi cinetici passivi e attivi dalle due somme sopra citate facendo alcune ragionevoli assunzioni sul sistema in studio.

3.1.4 Applicazione del modello per NLS-EGFP

NLS-EGFP può diffondere passivamente attraverso gli NPC e viene contemporaneamente trasportata all'interno del nucleo attraverso il meccanismo

3.1 Modello dinamico per la traslocazione nucleocitoplasmatica 46

di import, come descritto nelle sezioni precedenti. Si può ragionevolmente assumere che:

- Il complesso NLS-EGFP · importina- α si forma unicamente nel citoplasma, per questo $\alpha_C \neq 1$ e $\alpha_N = 1$ (si ricorda che $\alpha_{N/C}$ rappresenta la frazione molare della molecola cargo, in questo caso NLS-EGFP, non legata al macchinario di trasporto nei due compartimenti).
- La diffusione passiva di NLS-EGFP complessata col macchinario di trasporto è trascurabile se comparata con NLS-EGFP libera (assunzione che risulta giustificata per i complessi che riguardano importina/esportina, per i quali la traslocazione attraverso gli NPC è puramente energia-dipendente e quindi attiva), per questo $P_{NLS \cdot importina-\alpha} = 0$.

Ciò implica che $k_C(NLS - EGFP) = \nu_{C \rightarrow N} \cdot (1 - \alpha_C)$ e $k_N(NLS - EGFP) = 0$. Combinando con (3.11) si ottiene:

$$\frac{1}{\tau} = \left(\frac{K_{eq}}{V_C} + \frac{1}{V_N} \right) \cdot P_{NLS} \quad (3.15)$$

In questo modo P_{NLS} , il coefficiente di permeazione di NLS-EGFP, può essere facilmente calcolato utilizzando i parametri ottenuti dall'analisi FRAP: τ , K_{eq} , V_N e V_C .

A questo punto è possibile introdurre il parametro $\Phi_{C \rightarrow N}$, definito come:

$$\Phi_{C \rightarrow N} = P_{NLS} \cdot (K_{eq} - 1) [NLS - EGFP]_C^0 \quad (3.16)$$

Tale parametro rappresenta il *flusso attivo in eccesso* dal citoplasma verso il nucleo e corrisponde alla differenza tra il flusso globale $C \rightarrow N$ (passivo + attivo) e il flusso passivo puro $C \rightarrow N$. $\Phi_{C \rightarrow N}$ può essere facilmente ottenuto dai valori di P_{NLS} e K_{eq} , insieme al valore della concentrazione di NLS-EGFP nel citoplasma, ottenuta tramite il metodo descritto nel paragrafo 3.3. Essendo il prodotto di P_X che si misura in $\mu m^3/s$ per una concentrazione (μM), il flusso attivo in eccesso si esprime in 10^{-21} mol/s, ovvero in molecole al secondo moltiplicando per il fattore di conversione 602.

E' possibile dimostrare [57] che $\Phi_{C \rightarrow N}$ è direttamente proporzionale alla concentrazione del complesso fra NLS-EGFP e Importina(e), secondo:

$$\Phi_{C \rightarrow N} = [NLS \cdot Imp\alpha]_0^C \cdot (\nu_{C \rightarrow N} - P_{NLS}) \quad (3.17)$$

La concentrazione del complesso NLS-EGFP · Importina è a sua volta determinabile dalla concentrazione globale di NLS-EGFP e di importina presente nella cellula assumendo un semplice equilibrio di dissociazione del tipo:



e applicando la legge di azione di massa:

$$\begin{aligned} [NLS \cdot Imp\alpha]_0^C &= \\ &= \frac{[Imp\alpha]_0^C + [NLS]_0^C + K_D - \sqrt{([Imp\alpha]_0^C + [NLS]_0^C + K_D)^2 - 4[NLS]_0^C [Imp\alpha]_0^C}}{2} \end{aligned} \quad (3.19)$$

Nell'equazione (3.19), K_D rappresenta la costante di dissociazione del complesso NLS · Importina. La combinazione delle due equazioni (3.17) (3.19) rende possibile determinare parametri termodinamici di legame, come la K_D del complesso e dinamici di diffusione. E' pertanto conveniente il calcolo di $\Phi_{C \rightarrow N}$ in diverse condizioni di espressione del cargo attivamente trasportato dentro il nucleo.

3.2 Caratterizzazione dei costrutti trasfettati

La trasfezione dei costrutti di fusione DsRed-LaA e DsRed-HGPS in cellule U2OS in coltura ha permesso di valutare la localizzazione della lamina A *wt* e mutata *in vivo*. Come atteso, l'espressione della progerina (Fig. 3.3, pannello B) induce la formazione di lobulazioni a livello della Lamina Nucleare, mentre l'espressione della lamina A *wt* invece non produce un fenotipo simile (pannello A).

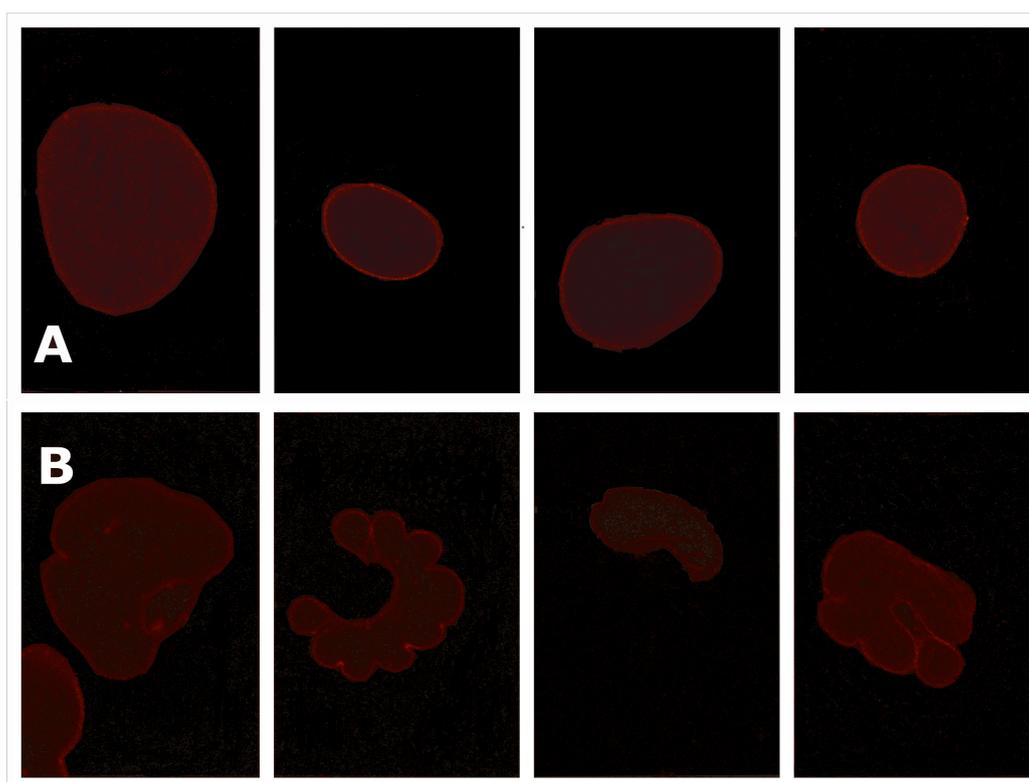


Figura 3.3: Caratterizzazione del costrutto DsRed-LaA. **A.** Espressione del costrutto DsRed-LaA; la fluorescenza si rileva a livello della Lamina Nucleare e i nuclei appaiono tondeggianti come nelle cellule non esprimenti il costrutto. **B.** Espressione del costrutto DsRed-HGPS; i nuclei risultano ricchi di lobulazioni e perdono il classico fenotipo tondeggiate.

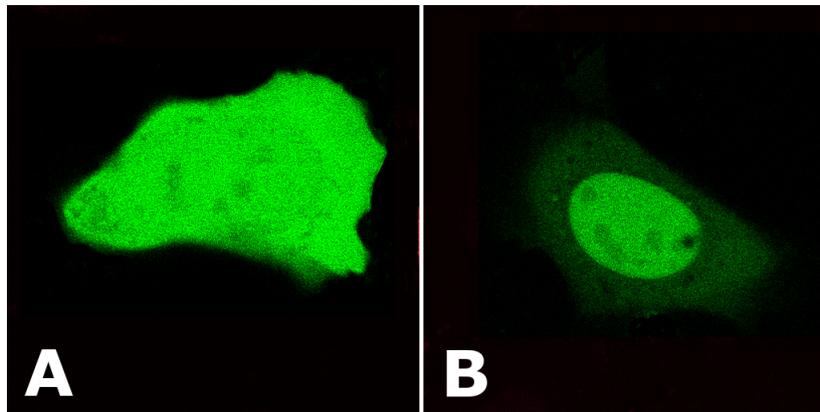


Figura 3.4: Localizzazione di EGFP e NLS-EGFP. **A.** La EGFP presenta una distribuzione uniforme all'interno della cellula (nucleo e citoplasma) in accordo con il suo peso molecolare di 27kDa che la rende capace di attraversare gli NPC per semplice diffusione passiva. **B.** Il Segnale di Localizzazione Nucleare posto in frame con la EGFP fa sì che essa sia importata nel nucleo. La proteina risulta comunque capace di attraversare gli NPC sia per diffusione passiva sia per trasporto facilitato, quest'ultimo però provvede a definire la differenza di segnale fluorescente tra i due compartimenti.

Per quanto riguarda la localizzazione delle proteine EGFP e NLS-EGFP, la localizzazione mostrata in Figura 3.4 risulta conforme alle aspettative, con la proteina EGFP egualmente distribuita tra citoplasma e nucleo in virtù del suo ridotto peso molecolare che la rende capace di traslocare liberamente tra i due compartimenti in entrambi i sensi. NLS-EGFP mostra invece una prevalente localizzazione intranucleare: il peptide NLS fuso con la proteina fluorescente la rende "riconoscibile" dal meccanismo di import nucleare, in particolare della importina- α ; ma essendo costituito da 7 amminoacidi non influisce sul peso molecolare della molecola nè sul suo volume effettivo per cui anche NLS-EGFP è libera di diffondere passivamente nel nucleo senza la mediazione delle importine; in questo senso, la sua presenza nel nucleo è frutto di entrambe le componenti diffusive descritte dal modello matematico, mentre la localizzazione citoplasmatica è dovuta al *recycling* puramente passivo tra compartimenti.

La doppia trasfezione DsRed-HGPS/NLS-EGFP e DsRed-LaA/ NLS-EGFP, come prevista dal disegno sperimentale in Tabella (2.1) permette dunque di effettuare l'analisi FRAP nei due diversi sistemi cellulari, in cel-

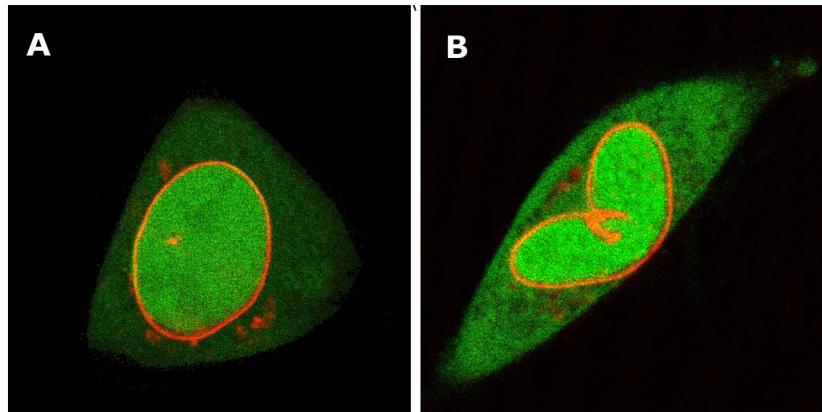


Figura 3.5: Espressione di DsRed-LaA/NLS-EGFP e DsRed-HGPS/NLS-EGFP. Le proteine espresse dai costrutti cotrasfettati risultano correttamente localizzati in entrambi i sistemi cellulari. La Lamina Nucleare risulta marcata dalla proteina tetrameric fluorescente DsRed sia nel caso di trasfezione con lamina *wt* che con progerina. In entrambe le cellule si possono osservare anche una localizzazione citoplasmatica delle proteine fuse a DsRed sottoforma di piccoli accumuli. **A.** DsRed-LaA + NLS-EGFP con nucleo tipicamente tondeggiante. **B** DsRed-HGPS + NLS-EGFP con nucleo deformato a causa dell'espressione della progerina.

lule modello per la Sindrome di Huchthinson-Gilford e in cellule di controllo (Figura 3.5).

3.3 Determinazione della concentrazione intracellulare di NLS-EGFP tramite calibrazione con Fluoresceina-Glicina

Per determinare il flusso attivo in eccesso con la (3.16), l'importante parametro descrivente il meccanismo di import, occorre conoscere la concentrazione intracellulare della proteina cargo NLS-EGFP in ciascuna cellula; dato, quest'ultimo, non desumibile dall'analisi FRAP. Essendo il prodotto di una trasfezione transiente, la concentrazione di tale proteina oscillerà entro un ampio range di valori in maniera del tutto stocastica, in quanto la sua espressione non è regolata fisiologicamente dalla cellula. A tal fine, quindi, una possibilità consisteva nell'utilizzare una soluzione a concentrazione nota di EGFP per effettuare la calibrazione, ma la EGFP ha la tendenza ad aderire al fondo della Petri, formando gradienti lungo l'asse *z*. Per ovviare al

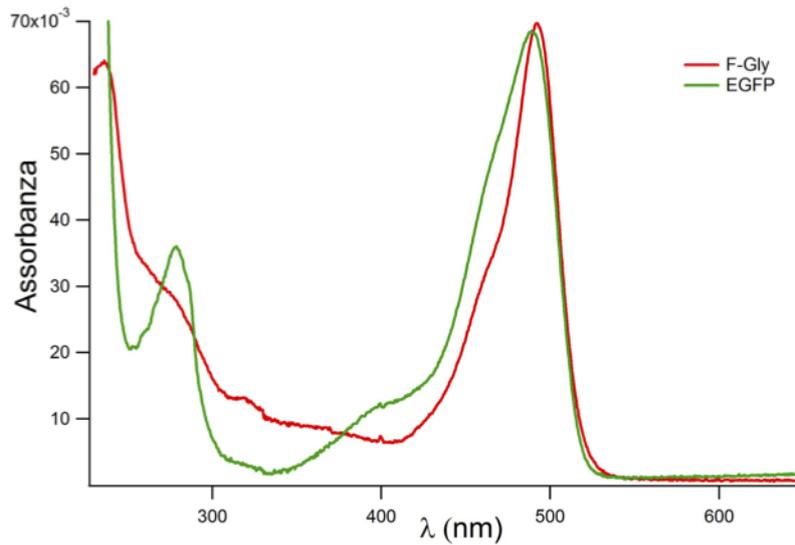


Figura 3.6: Spettri di assorbimento EGFP e F-Gly. Il grafico mostra la buona sovrapposizione degli spettri di assorbimento di EGFP e F-Gly; un comportamento del tutto analogo si riscontra anche negli spettri di emissione.

problema è stata utilizzata Fluoresceina-Glicina (F-Gly) come standard per calibrare il sistema: il composto ha delle caratteristiche spettrali del tutto simili a quelle della EGFP (Figura 3.6) ed è capace di distribuirsi omogeneamente nel volume della piastra. Il segnale di fluorescenza di F-Gly è stato acquisito al microscopio confocale utilizzando gli stessi intervalli di eccitazione e acquisizione utilizzati per il resto degli esperimenti con la NLS-EGFP; i conteggi della fluorescenza sono stati poi convertiti in valori di concentrazione tenendo in considerazione il rapporto delle intensità luminose tra EGFP e F-Gly. I valori di concentrazione di NLS-EGFP per ciascuna cellula in cui sono tutti riportati nelle tabelle in Appendice A, insieme agli altri parametri sperimentali ottenuti dall'analisi FRAP.

3.4 Analisi FRAP della cinetica di import nucleare in cellule esprimenti progerina e in cellule di controllo

Le misure FRAP sono state eseguite su cellule correttamente cotrasfettate secondo le modalità descritte nel paragrafo 2.4 (Figura 3.7). Dal fit di ciascuna curva di recupero della fluorescenza mediante (3.12) sono stati ottenuti i principali parametri sperimentali: K_{eq} , la costante di recupero τ_F e il volume nucleare V_N e citoplasmatico V_C (Figura 3.8). La concentrazione intracellulare di NLS-EGFP ($[NLS - EGFP]$) è stata calcolata dai conteggi di fluorescenza prima del *bleaching*, utilizzando la calibrazione con F-Gly come descritto nel paragrafo 3.3, come descritto nel paragrafo 3.3. Tutti questi valori sono stati combinati utilizzando le equazioni descritte nelle sezioni precedenti (paragrafo 3.1.4), in particolare la (3.15) e (3.16) al fine di ottenere $\Phi_{C \rightarrow N}$, ovvero il flusso attivo in eccesso di NLS-EGFP dal citoplasma al nucleo, e P_N , ovvero la permeabilità della membrana nucleare, sia per le cellule cotrasfettate coi costrutti DsRed-LaA/NLS-EGFP che per quelle cotrasfettate con DsRed-HGPS/NLS-EGFP. (Tutti i dati sono riportati nelle tabelle contenute nell' AppendiceA).

3.4.1 La trasfezione del costrutto DsRed-LaA non altera i parametri di trasporto

Allo scopo di mettere in luce eventuali anomalie del processo di import in cellule affette dalla Progeria, le cellule trasfettate col costrutto DsRed-HGPS sono state confrontate con cellule di controllo, in cui è stata trasfettata la lamina A *wt* fusa con la proteina fluorescente DsRed. Se la trasfezione della forma *wt* della proteina abbinata ad una sonda fluorescente è stata necessaria per porsi nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate per indurre della malattia, è stato però prima valutato che la cotrasfezione DsRed-LaA/NLS-EGFP non inficiasse in alcun modo il trasporto nucleocitoplasmatico, comparando i parametri dinamici relativi al meccanismo di import di tale gruppo di cellule con quelli di cellule trasfettate unicamente col costrutto NLS-EGFP.

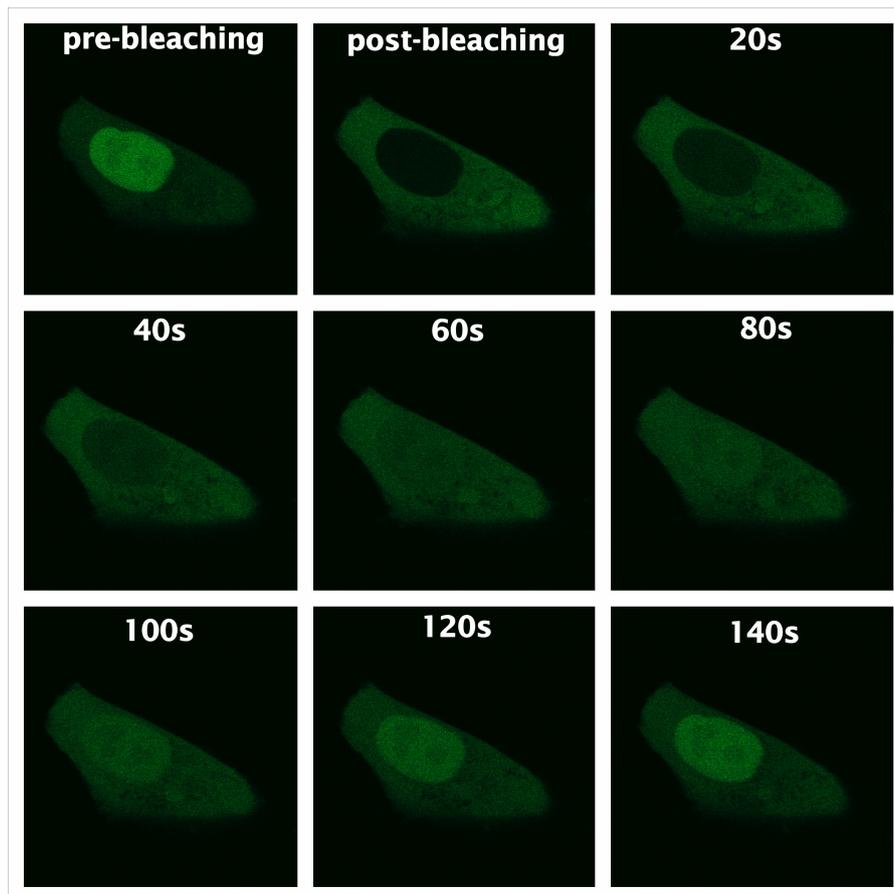


Figura 3.7: FRAP: recupero della fluorescenza a livello nucleare. La serie di immagini in alto costituisce la serie temporale degli eventi di un esperimento FRAP; è riportata un'immagine *prebleaching*, un'immagine *postbleaching* e poi una serie di immagini acquisite ogni 20.

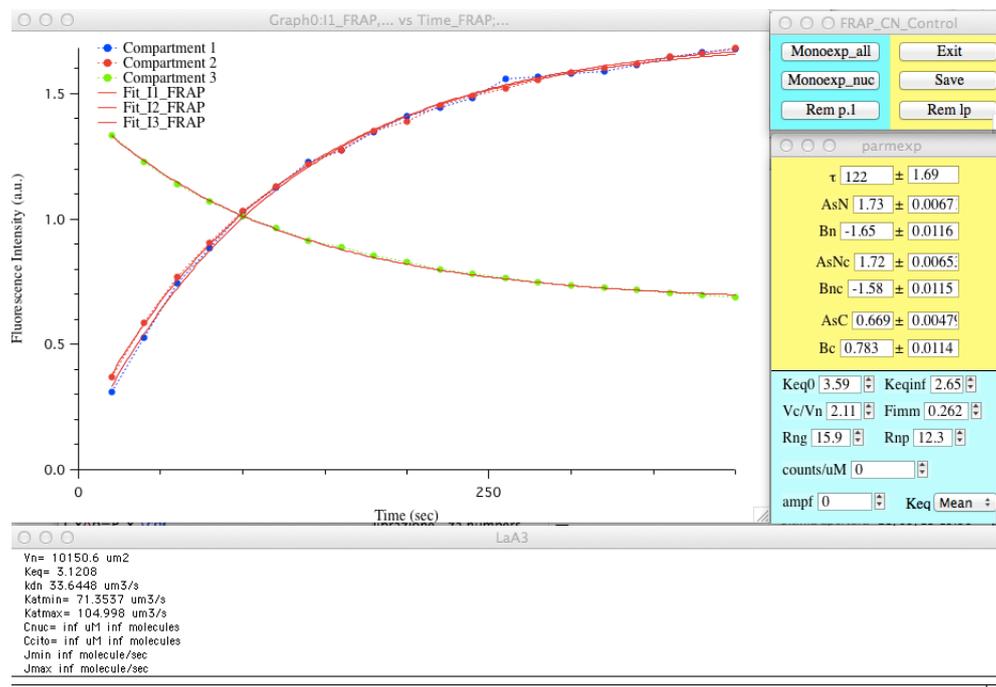


Figura 3.8: Curva sperimentale di recupero della fluorescenza. Tramite una procedura implementata sul software libero Igor Pro (WaveMetrics), versione 5, la curva di recupero della fluorescenza viene fittata con la (3.12) e si ottengono in output i principali parametri sperimentali definiti precedentemente.

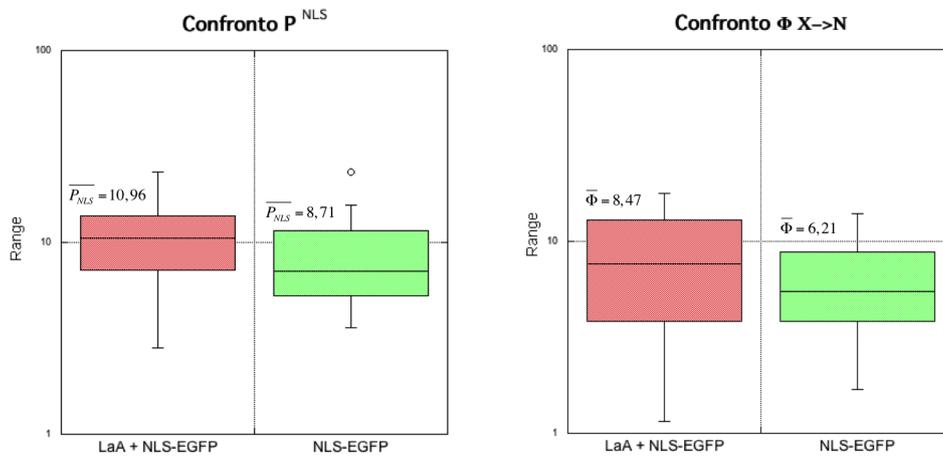


Figura 3.9: Box-plot P_{NLS} e $\Phi_{C \rightarrow N}$. Rappresentazione grafica della distribuzione del dato campionario per le cellule cotrasfettate con DsRed-LaA/NLS-EGFP $n = 36$ e trasfettate con NLS-EGFP $n = 20$

Si è considerato un sotto campione di cellule selezionato in base alla $[NLS - EGFP]_C$ all'interno del campione di cellule cotrasfettate con DsRed-LaA/NLS-EGFP (Tabella A in Appendice A), al fine di rendere confrontabili i parametri cinetici del flusso attivo in eccesso ($\Phi_{C \rightarrow N}$) e del coefficiente di permeazione (P_{NLS}) tra quest'ultimo gruppo di cellule e il gruppo di cellule trasfettato unicamente col costrutto NLS-EGFP (Tabella A in Appendice A). Entro l'intervallo di concentrazione $1,82\mu M - 0,06\mu M$, range comune ai due gruppi sperimentali, le distribuzioni dei valori di P_{NLS} e di $\Phi_{C \rightarrow N}$ non mostrano sostanziali differenze (Figure A.1 e A.2 in Appendice A). I *box-plot* riportati in Figura 3.9 dimostrano ulteriormente come nell'intervallo di concentrazioni prima citato i parametri cinetici siano del tutto comparabili, dimostrazione che consente di poter considerare il gruppo di cellule cotrasfettato con i costrutti DsRed-LaA/NLS-EGFP come gruppo di controllo rappresentante una condizione fisiologica del processo di import e del processo di diffusione passiva attraverso gli NPC.

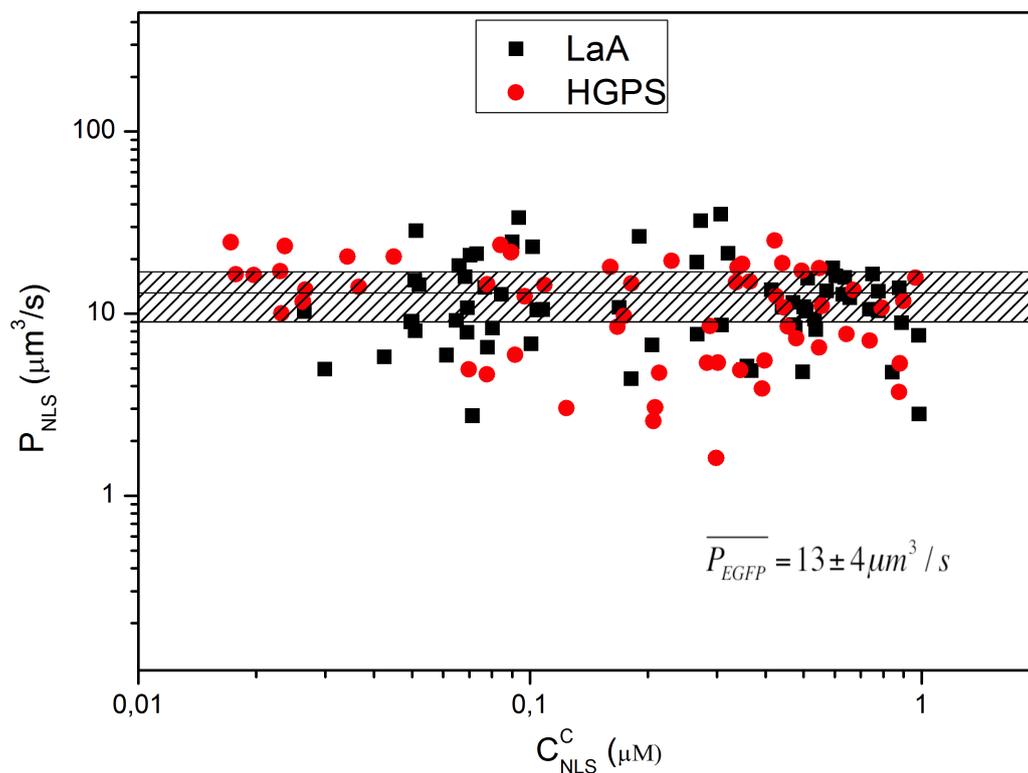


Figura 3.10: Grafico P_{NLS} versus $[NLS - EGFP]$. Il grafico mostra il coefficiente di permeabilità della membrana nucleare plottato contro la concentrazione di NLS-EGFP nel citoplasma per ciascuna cellula. In rosso le cellule esprimenti il costrutto DsRED-HGPS (n=60), affette dalla Progerina, e in nero le cellule di controllo, esprimenti il costrutto DsRed-LaA *wt* (n=76).

3.4.2 Diffusione passiva e trasporto attivo: confronto tra il modello cellulare per la Progeria e le cellule di controllo DsRed-LaA

Il confronto del valore di P_{NLS} (coefficiente di permeazione) in cellule esprimenti DsRed-LaA e DsRed-HGPS è riportato nel grafico in Figura 3.10, in cui per ciascuna cellula è stato plottato il valore del coefficiente di permeazione contro la concentrazione di NLS-EGFP calcolata. Per definizione, il coefficiente di permeazione dipende da alcune caratteristiche dell’NPC, quali la sua numerosità, l’area geometrica del poro e la lunghezza del canale (come descritto nel paragrafo 3.1.1), caratteristiche che dipendono dal tipo cellulare in esame e che sono geneticamente regolate dalla cellula; di conseguenza non mostra una particolare dipendenza dalla concentrazione di molecola cargo presente. Ciò che è possibile invece osservare dal grafico è che la Progeria indotta nelle cellule con la trasfezione di DsRed-HGPS non inficia la diffusione passiva di NLS-EGFP se si compara con i valori ottenuti per cellule trasfettate con DsRed-LaA. Inoltre, il set di valori di P_{NLS} osservato risulta non dissimile da quello calcolato con le medesime modalità (FRAP e applicazione del modello matematico, dati non mostrati), per la proteina EGFP priva dell’NLS, il cui valor medio è pari a $13 \pm 4 \mu m^3/s$ (area ombreggiata del grafico). Questo risultato può essere spiegato se si considera che l’NLS consta di 7 amminoacidi (PKKKRKV) per cui il peso molecolare e di conseguenza le proprietà dinamiche di diffusione passiva attraverso gli NPC di NLS-EGFP e EGFP sono pressoché identiche.

Il processo di import può essere invece valutato tramite l’analisi del flusso attivo in eccesso ($\Phi_{C \rightarrow N}$) nei due sistemi cellulari. Tale parametro è dipendente dalla concentrazione della proteina cargo, per cui, come è possibile osservare dal grafico in Figura 3.11, esso assume un andamento di crescita lineare con l’aumento della concentrazione citoplasmatica di NLS-EGFP riportata sull’asse delle ascisse. Di nuovo non si osservano differenze statisticamente significative se si comparano le cellule esprimenti DsRed-HGPS e quelle esprimenti DsRed-LaA per quanto riguarda la cinetica di import nucleare.

Se si assume che la concentrazione di importina- α nella cellula è approssimativamente costante in quanto regolata dalla cellula stessa, è possibile affermare da un punto di vista molecolare che fin tanto che la concentrazione di NLS-EGFP rimane entro un range fisiologicamente accettabile, si formano complessi *importina* - $\alpha \cdot NLS$ che traslocano nel nucleo, condizione che si riflette nella crescita lineare dei flussi attivi in eccesso calcolati su cellule con diverso grado di trasfezione del cargo NLS-EGFP. All'aumentare di tale concentrazione, però, l'importina- α si satura e l'andamento dei flussi attivi in eccesso raggiunge un plateau (evento non osservato nei nostri esperimenti). E' possibile che sotto queste condizioni saturanti (*importina* - α] costante, $[NLS - EGFP]$ elevata), il meccanismo di import in cellule affette dalla Progeria possa presentare delle anomalie.

3.5 Conclusioni

La tecnica di *Fluorescence Recovery After Photobleaching* è risultata essere un ottimo strumento di indagine per lo studio del trasporto nucleocitoplasmatico, sfruttando le potenzialità della microscopia confocale e la trasfezione transiente di proteine fluorescenti, per una completa caratterizzazione dei parametri cinetici delle proteine cargo impegnate nella traslocazione attraverso gli NPC; caratterizzazione che, per altro, può essere ottenuta tramite semplice formalismo matematico.

Nell'ambito del problema biologico posto in questo lavoro di tesi, i risultati dello studio FRAP hanno dimostrato che non sussiste alcuna alterazione della cinetica del trasporto nucleocitoplasmatico attivo e passivo, come si evince dall'analisi di $\Phi_{C \rightarrow N}$ e di P_{NLS} , suggerendo che l'assemblaggio scorretto della Lamina Nucleare nell'HGPS non influenza il trasporto attraverso gli NPC. Se si considerano le evidenti manifestazioni a livello strutturale della Progeria, con cellule aventi nuclei aberranti, risulta piuttosto sorprendente che le proprietà dinamiche del processo di import nucleare e della diffusione passiva non risultino alterate in queste cellule. Se dunque si può escludere un coinvolgimento del trasporto nucleocitoplasmatico nella drammatica manifestazione di sintomi e alterazioni fenotipiche che caratterizza la Progeria,

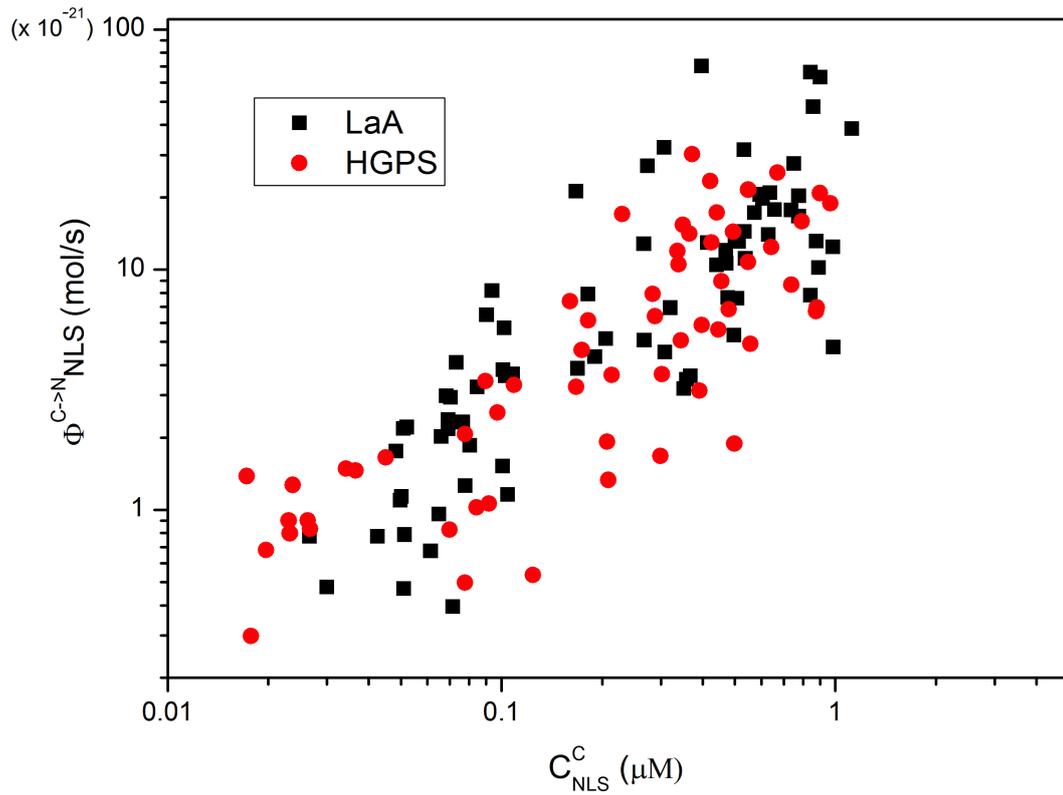


Figura 3.11: Grafico $\Phi_{C \rightarrow N}$ *versus* $[NLS - EGFP]$. Il grafico mostra il flusso attivo in eccesso dal citoplasma al nucleo plottato contro la concentrazione di NLS-EGFP nel citoplasma per ciascuna cellula. In rosso le cellule esprimenti il costrutto DsRED-HGPS ($n=60$), affette dalla Progerina, e in nero le cellule di controllo, esprimenti il costrutto DsRed-LaA *wt* ($n=76$). Il flusso attivo in eccesso si esprime in 10^{-21} mol/s.

è possibile ipotizzare che sia invece l'espressione genica il processo che risulta difettivo nelle cellule HGPS, considerando che tra i ruoli svolti dalla LN, oltre all'ancoraggio degli NPC e alla determinazione della struttura nucleare, c'è anche quello di organizzare l'eterocromatina periferica e di predisporre regioni ad alta e bassa trascrizione.

APPENDICE A

Dati sperimentali

DsRed-LaA + NLS-GFP

Cellula	$\tau_{\mathbf{F}}$ (s)	K_{eq}	$[NLS - GFP](\mu M)$	$P_x(\mu m^3/s)$	$\Phi_{C \rightarrow N}(mol/s)$
1	115	3.77	0.080	8.347	1.858
2	69	4.98	0.069	7.911	2.176
3	74	2.99	0.070	20.996	2.940
4	72	3.73	0.068	15.986	2.980
5	60	3.63	0.073	21.364	4.110
6	55	3.90	0.090	24.752	6.474
7	64	4.23	0.108	10.540	3.671
8	61	4.01	0.085	12.767	3.248
9	114	2.71	0.987	2.814	4.748
10	56	3.31	0.414	13.543	12.937
11	90	3.53	0.538	8.182	11.129
12	92	3.47	0.267	7.690	5.078
13	84	3.24	0.497	4.797	5.340
14	71	3.59	0.472	8.696	10.621
15	80	4.75	0.205	6.710	5.160
16	79	3.50	0.267	19.168	12.791
17	79	2.45	0.508	10.311	7.588
18	81	3.41	0.501	10.900	13.169
19	139	3.01	0.071	2.753	0.395
20	172	3.17	0.077	13.933	2.318
21	122	3.59	0.094	33.645	8.159
22	97	3.21	0.101	6.819	1.518
23	79	2.61	0.065	9.161	0.958
24	120	10.90	0.181	4.392	7.889

25	174	3.08	0.637	15.763	20.880
26	53	2.74	0.631	12.757	13.998
27	69	2.94	0.842	4.784	7.817
28	53	2.69	0.309	8.681	4.529
29	105	3.19	0.441	10.813	10.448
30	84	3.02	0.368	4.871	3.619
31	77	2.66	0.984	7.609	12.430
32	83	2.84	0.351	4.949	3.200
33	77	2.89	0.359	5.159	3.496
34	68	2.01	0.320	21.440	6.939
35	61	2.94	0.594	17.833	20.543
36	67	3.26	0.572	13.353	17.261
37	126	2.85	0.397	95.753	70.302
38	110	2.67	0.066	18.337	2.020
39	121	2.28	0.890	8.936	10.182
40	100	3.07	0.776	10.395	16.703
41	82	2.97	0.776	13.260	20.275
42	86	2.08	0.877	13.859	13.132
43	86	3.48	0.078	6.522	1.260
44	89	2.96	1.121	17.534	38.513
45	71	3.41	0.102	23.284	5.711
46	99	2.63	0.512	15.671	13.082
47	77	3.03	0.605	16.090	19.766
48	48	3.12	0.169	10.815	3.879
49	85	2.77	0.843	44.412	66.237
50	74	3.95	0.052	14.379	2.209
51	56	1.67	0.899	104.993	63.244
52	80	3.21	0.657	12.237	17.757
53	129	3.23	0.751	16.523	27.662
54	93	4.06	0.273	32.367	27.053
55	68	2.86	0.167	68.219	21.201
56	95	2.35	0.533	43.898	31.571
57	83	3.27	0.737	10.571	17.674
58	81	2.56	0.858	35.604	47.663
59	49	3.99	0.307	35.172	32.301
60	97	3.89	0.534	9.324	14.384
61	129	2.92	0.476	8.367	7.648
62	101	3.22	0.470	11.523	12.025
63	75	2.86	0.061	5.916	0.674
64	87	2.14	0.051	8.072	0.469
65	33	1.53	0.103	66.352	3.608
66	108	2.06	0.104	10.479	1.158
67	33	1.74	0.101	51.253	3.827
68	131	3.44	0.050	9.021	1.095
69	71	1.54	0.051	28.521	0.789
70	142	3.50	0.050	9.077	1.136
71	76	3.84	0.027	10.287	0.776
72	72	4.21	0.030	4.952	0.476
73	96	1.86	0.190	26.495	4.332

Studio del trasporto nucleocitoplasmatico in una condizione di assemblaggio difettivo della Lamina Nucleare

74	88	3.81	0.051	15.262	2.179
75	68	4.15	0.043	5.788	0.775
76	125	4.17	0.069	10.782	2.367

Tabella A.1: Tabella riassuntiva dei dati sperimentali. La tabella riporta tutti i dati ottenuti negli esperimenti di cotrasfezione DsRed-LaA e NLS-GFP. Per ogni cellula vengono riportati τ_F , K_{eq} , $[NLS-GFP]$, P_x e $\Phi_{C \rightarrow N}$.

DsRed-HGPS + NLS-GFP

Cellula	τ_F (s)	K_{eq}	$[NLS - GFP](\mu M)$	$P_x(\mu m^3/s)$	$\Phi_{C \rightarrow N}(mol/s)$
1	143	2.86	0.792	10.774	15.873
2	131	2.48	0.881	5.330	6.949
3	84.6	2.69	0.494	17.168	14.344
4	94	3.8	0.671	13.475	25.320
5	104	2.97	0.899	11.748	20.811
6	97.2	3.2	0.548	17.813	21.495
7	113	3.19	0.421	25.263	23.314
8	77.3	2.34	0.372	60.678	30.262
9	101	2.43	0.124	3.021	0.536
10	94	2.17	0.446	10.795	5.634
11	94.8	3.4	0.070	4.943	0.827
12	78.3	3.29	0.167	8.479	3.250
13	43.5	3.55	0.161	18.030	7.380
14	74.5	3.06	0.441	19.000	17.276
15	80.8	3.34	0.349	18.819	15.367
16	100	3.26	0.302	5.378	3.672
17	49.9	3.68	0.398	5.524	5.886
18	103	6.19	0.284	5.372	7.907
19	134	5.89	0.498	0.775	1.888
20	161	4.49	0.299	1.609	1.678
21	73	4	0.345	4.900	5.069
22	68.7	4.6	0.214	4.731	3.645
23	65.1	4.61	0.207	2.576	1.923
24	57.5	2.72	0.339	18.006	10.501
25	64.6	4.01	0.548	6.520	10.748
26	74.3	3.5	0.643	7.719	12.412
27	54.5	2.76	0.090	21.779	3.431
28	58.7	3.31	0.182	14.643	6.145
29	85.2	3.06	0.392	3.882	3.133
30	73.5	2.65	0.738	7.099	8.640
31	74.1	2.95	0.480	7.308	6.836
32	69.9	1.8	0.556	11.048	4.913
33	63.6	2.38	0.078	4.650	0.498
34	76.4	3.08	0.209	3.062	1.331
35	56.3	3.3	0.456	8.517	8.934
36	78.1	3.12	0.109	14.350	3.312

37	75.1	2.95	0.092	5.947	1.063
38	66.4	3.59	0.288	8.559	6.392
39	125	4.8	0.230	19.493	17.035
40	90.2	2.83	0.078	14.504	2.065
41	46.3	3.1	0.034	20.616	1.482
42	68.8	3.1	0.097	12.468	2.543
43	74.3	2.24	0.965	15.765	18.869
44	76.3	3.39	0.336	14.846	11.935
45	80.5	3.44	0.425	12.502	12.969
46	107	3.56	0.793	39.585	80.408
47	115	3.06	0.876	3.720	6.711
48	93.7	3.74	0.174	9.701	4.620
49	90.6	3.58	0.365	14.985	14.117
50	44.5	1.51	0.084	23.879	1.024
51	54.6	2.78	0.045	20.613	1.651
52	59.1	3.12	0.020	16.283	0.681
53	88.4	3.28	0.023	17.162	0.902
54	102	2.02	0.018	16.471	0.298
55	88.2	3.28	0.024	23.496	1.269
56	107	3.3	0.027	13.537	0.832
57	111	3.84	0.037	14.039	1.458
58	92	4.43	0.023	10.026	0.799
59	81.4	3.95	0.026	11.632	0.903
60	70.6	4.24	0.017	24.712	1.381

Tabella A.2: Tabella riassuntiva dei dati sperimentali. La tabella riporta tutti i dati ottenuti negli esperimenti di cotrasfezione DsRed-HGPS e NLS-GFP. Per ogni cellula vengono riportati τ_F , K_{eq} , [NLS-GFP], P_x e $\Phi_{C \rightarrow N}$.

NLS-GFP

Cellula	τ_F (s)	K_{eq}	[NLS - GFP](μM)	P_x ($\mu m^3/s$)	$\Phi_{C \rightarrow N}$ (mol/s)
1	106	3.26	0.186481217	5.81884	2.452
2	102	2.97	0.270975144	9.8684	5.268
3	61.4	2.86	0.22453911	5.75426	2.403
4	75.1	3.77	0.544235237	6.47366	9.759
5	116	2.58	0.648790022	11.262	11.545
6	85.8	4.46	0.237106323	11.7762	9.661
7	112	2.72	0.29866478	8.30632	4.267
8	66	3.26	0.665177765	4.61625	6.940
9	107	3.43	0.473352719	4.78794	5.507
10	95.9	3.52	0.198704459	4.58739	2.297
11	103	3.41	0.193114937	3.6159	1.683
12	134	1.6	1.283858073	12.2754	9.456
13	291	2.04	1.825050337	4.31185	8.184
14	185	1.56	1.60481952	6.12079	5.501
15	105	1.85	0.924396485	8.67555	6.817
16	101	2.93	0.13968277	15.7554	4.247

Studio del trasporto nucleocitoplasmatico in una condizione di assemblaggio difettivo della Lamina Nucleare

17	114	2.51	0.11127876	23.3939	3.931
18	106	1.85	1.224854826	13.4678	14.022
19	114	1.99	0.877923597	7.63287	6.634
20	147	2.05	0.625338596	5.73201	3.764

Tabella A.3: Tabella riassuntiva dei dati sperimentali. La tabella riporta tutti i dati ottenuti negli esperimenti di singola trasfezione del costrutto NLS-GFP. Per ogni cellula vengono riportati τ_F , K_{eq} , [NLS-GFP], P_x e $\Phi_{C \rightarrow N}$.

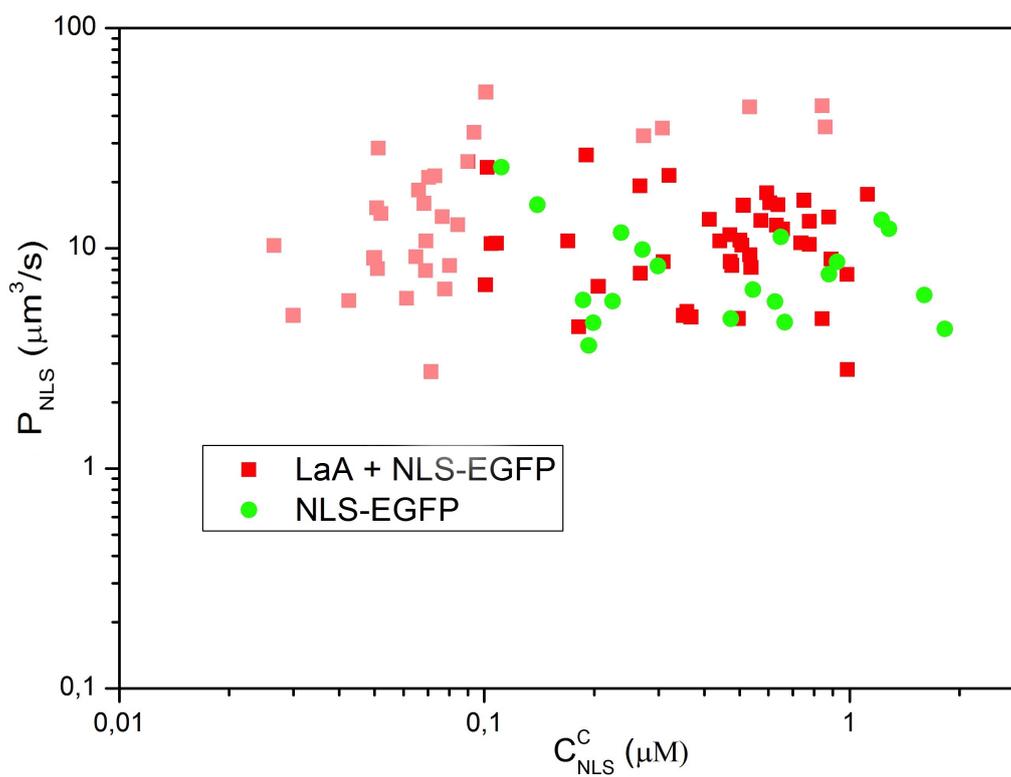


Figura A.1: Confronto P_{NLS} . Il grafico mostra l'andamento del coefficiente di permeazione P_{NLS} in cellule trasfettate con DsRed-LaA + NLS-EGFP (rosso) e cellule trasfettate con NLS-EGFP (verde). Per l'intervallo di concentrazione citoplasmatica di NLS-EGFP messo in evidenza non si riscontrano sostanziali differenze tra i due sistemi cellulari per quanto riguarda P_{NLS} .

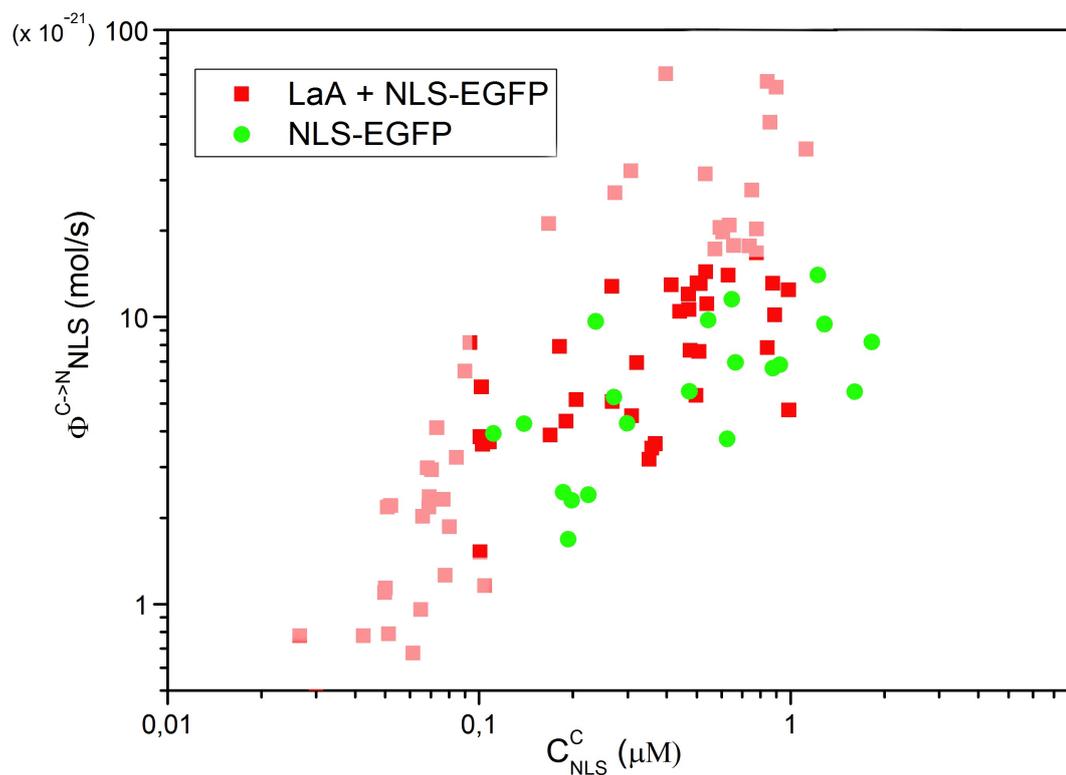


Figura A.2: Confronto $\Phi_{\text{C} \rightarrow \text{N}}$. Il grafico mostra l'andamento del flusso attivo in eccesso $\Phi_{\text{C} \rightarrow \text{N}}$ in cellule trasfettate con DsRed-LaA + NLS-EGFP (rosso) e cellule trasfettate con NLS-EGFP (verde). Per l'intervallo di concentrazione citoplasmatica di NLS-EGFP messo in evidenza non si riscontrano sostanziali differenze tra i due sistemi cellulari per quanto riguarda $\Phi_{\text{C} \rightarrow \text{N}}$.

Bibliografia

- [1] Robert D Goldman, Yosef Gruenbaum, Robert D Moir, Dale K Shumaker, and Timothy P Spann. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev*, 16(5):533–47, Mar 2002. doi: 10.1101/gad.960502.
- [2] Erich Nigg. Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Seminar Cell Biology*, 1992.
- [3] Howard J Worman. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol*, 226(2):316–25, Jan 2012. doi: 10.1002/path.2999.
- [4] Antonio E Rusiñol and Michael S Sinensky. Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci*, 119(Pt 16):3265–72, Aug 2006. doi: 10.1242/jcs.03156.
- [5] F Lin and Howard J Worman. Structural organization of the human gene (*Imnb1*) encoding nuclear lamina b1. *Genomics*, 1995.
- [6] Christopher J Hutchinson and Howard J Worman. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol*, 2004.
- [7] Thomas Dechat, Katrin Pflieger, Kaushik Sengupta, Takeshi Shimi, Dale K Shumaker, Liliana Solimando, and Robert D Goldman. Nuclear lamin: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes e Development*, 2008.
- [8] Martin Bergo, Bryant Gavino, and Jed Ross. *Zmpste24* deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin a processing defects. *PNAS*, 2002.

- [9] Alberto Pendas, Zhongjun Zhou, and Juan Cadiñanos. Defective prelamin a processing and muscular and adipocyte alterations in *zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nature Genetics*, 2002.
- [10] LG Fong, JK Ng, and M et al. Meta. Heterozygosity for *lmna* deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in *zmpste24*-deficient mice. *PNAS*, 2004.
- [11] LG Fong, D Frost, and M et al. Meta. A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science*, 2006.
- [12] KL Reddy, JM Zullo, E Bertolino, and et al. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, 2008.
- [13] Timothy P Spann, Robert D Moir, Anne E Goldman, and et al. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits dna synthesis. *J Cell Biol*, 1997.
- [14] MY Tsai, S Wang, JM Heidinger, and et al. A mitotic lamin b matrix induced by *rangtp* required for spindle assembly. *Science*, 2006.
- [15] Christopher J Hutchinson. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(11):848–58, Nov 2002. doi: 10.1038/nrm950.
- [16] G Bonne, MR Di Barletta, and S et al. Various. Mutations in the gene encoding lamin a/c cause autosomal dominant emery-dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 1999.
- [17] H Cao and R A Hegele. Nuclear lamin a/c r482q mutation in canadian kindreds with dunningan-type family partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 2000.
- [18] A De Sandre-Giovannoli, M Chanouch, S Kozlov, and et.al. Homozygous defects in *lmna*, encoding lamin a/c nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (charcot-marie-tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet*, 2002.
- [19] H Gilford. Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age. *Br Med Journal*, 1904.
- [20] Christopher J Hutchison. Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother

- had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six. *Lancet*, 1886.
- [21] R L Pollex and R A Hegele. Hutchinson-gilford progeria syndrome. *Clin Genet*, 66(5):375–81, Nov 2004. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00315.x.
- [22] Michael W Glynn and Thomas W Glover. Incomplete processing of mutant lamin a in hutchinson-gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet*, 14(20):2959–69, Oct 2005. doi: 10.1093/hmg/ddi326.
- [23] Sita Reddy and Lucio Comai. Lamin a, farnesylation and aging. *Exp Cell Res*, 318(1):1–7, Jan 2012. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.08.009.
- [24] Howard J Worman and Jean-Claude Courvalin. How do mutations in lamins a and c cause disease? *The Journal of Clinical Investigation*, 2004.
- [25] T Sullivan and et al. Loss of a-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.*, 1999.
- [26] V Nikolova and et al. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin a/c-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 2004.
- [27] Timothy P Spann, Anne E Goldman, Chen Wang, Sui Huang, and Robert D Goldman. Alteration of nuclear lamin organization inhibits rna polymerase ii-dependent transcription. *J Cell Biol*, 156(4):603–8, Feb 2002. doi: 10.1083/jcb.200112047.
- [28] A Csoka, S English, C Simkevich, D Ginzinger, A Butte, G Schatten, F Rothman, and J Sedivy. Genome-scale expression profiling of hutchinson-gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated. *Aging Cell*, 2004.
- [29] J Lammerding and et al. Lamin a/c deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.*, 2004.
- [30] CD Ragnauth, DT Warren, T Liu, R McNair, T Tajsic, N Figg, R Shroff, J Skepper, and CM Shanahan. Prelamin a acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation* 121, 2010.

- [31] J Candelario, S Sudhakar, S Navarro, S Reddy, and Lucio Comai. Perturbation of wild-type lamin a metabolism results in a progeroid phenotype. *Aging Cell* 7, 2008.
- [32] E Koshimizu, S Imamura, J Qi, Toure, DM Valdez Jr., CE Carr, J Hannai, and Kishi. Embryonic senescence and laminopathies in a progeroid zebrafish model. *PLoS One* 6, 2001.
- [33] Susan R Wenthe and Michael P Rout. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10):a000562, Oct 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a000562.
- [34] T Jamali, Y Jamali, M Mehrbod, and M R K Mofrad. Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol*, 287:233–86, 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00006-2.
- [35] M Suntharalingam and Susan R Wenthe. Peering through the pore: Nuclear pore complex structure, assembly and function. *Dev Cell*, 2003.
- [36] Dirk Gorlich. Transport into and out of the cell nucleus. *The EMBO Journal*, 1998.
- [37] A Sorokin, E Kim, and Ovchinnikov L. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry*, 2007.
- [38] S Kuersten, M Ohno, and I Mattaj. Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol*, 2001.
- [39] Ueli Aebi, L Buhle, and L Gerace. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate filament type filaments. *Nature*, 1986.
- [40] M Goldberg and T. Allen. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 1996.
- [41] C Smythe, H Jenkins, and Christopher J Hutchison. Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of xenopus eggs. *EMBO*, 2000.
- [42] Walther TC and et al. The nucleoporin nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *EMBO*, 2001.

- [43] J Lui, T Rolef Ben-Shahar, D Riemer, M Treinin, K Spann, A Weber, A Fire, and Yosef Gruenbaum. Essential roles for caenorhabditis elegans lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complex. *Mol. Bio. Cell*, 2000.
- [44] Albert Busch, Tilman Kiel, Wolfgang-M Heupel, Manfred Wehnert, and Stefan Hübner. Nuclear protein import is reduced in cells expressing nuclear envelopathy-causing lamin a mutants. *Exp Cell Res*, 315(14): 2373–85, Aug 2009. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.05.003.
- [45] Robert D Goldman, Dale K Shumaker, Michael R Erdos, Maria Eriksoon, Anne E Goldman, Leslie B Gordon, Yosef Gruenbaum, Satya Khuon, Melissa Mendez, Renee Varga, and Francis S Collins. Accumulation of mutant lamin a causes progressive changes in nuclear architecture in hutchinson-gilford progeria syndrome. *PNAS*, 2004.
- [46] Joshua B Kelley, Sutirtha Datta, Chelsi J Snow, Mandovi Chatterjee, Li Ni, Adam Spencer, Chun-Song Yang, Caelin Cubeñas-Potts, Michael J Matunis, and Bryce M Paschal. The defective nuclear lamina in hutchinson-gilford progeria syndrome disrupts the nucleocytoplasmic ran gradient and inhibits nuclear localization of ubc9. *Mol Cell Biol*, 31(16):3378–95, Aug 2011. doi: 10.1128/MCB.05087-11.
- [47] J. Lippincott-Schwartz and G.H. Patterson. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super resolution imaging. *Trends Cell Biol*, 2009.
- [48] R Peters, J Peters, H Tews, and W Bahr. A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1974.
- [49] HV Goodson, JS Dzurisin, and P Wadsworth. Methods for expressing and analyzing gfp-tubulin and gfp-microtubule-associated protein. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010.
- [50] P Monetta, I Slavin, N Romero, and C Alvarez. Rab1b interacts with gbf1 and modulates both arf1 dynamics and copi association. *Mol. Bio. Cell*, 2007.
- [51] M Dundr, U Hoffmann-Rohrer, Q Hu, I Grummt, LI Rothblum, RD Phair, and Tom Misteli. A kinetic framework for a mammalian rna polymerase in vivo. *Science*, 2002.

- [52] B Giese, CK Au-Yeung, A Hermann, S Diefenbach, C Haan, A Kuster, SB Wortmann, C Roderburg, PC Heinrich, U Behrmann, and G Muller-Newen. Long term association of the cytokine receptor gp130 and the janus kinase jak1 revealed by frap analysis. *J Biol Chem*, 2003.
- [53] m Kang, CA Day, K Drake, AK Kenworthy, and E DiBenedetto. A generalization of theory for two-dimensional fluorescence recovery after photobleaching applicable to confocal laser scanning microscope. *Biophys J*, 2009.
- [54] EAJ Reits and J Neefjes. From fixed to frap: measuring protein mobility and activity in living cell. *Nat Cell Biol*, 2001.
- [55] RV Tsien. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998.
- [56] Katerina Niforou, Athanasios Anagnostopoulos, Konstantinos Vougas, Christos Kittas, Vassilis Gorgoulis, and George Tsangaris. The proteome profile of the human osteosarcoma u2os cell line. *Cancer Genomics and Proteomics*, 2008.
- [57] Ranieri Bizzarri, Francesco Cardarelli, Michela Serresi, and Fabio Beltram. Fluorescence recovery after photobleaching reveals the biochemistry of nucleocytoplasmic exchange. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012.
- [58] B Naim, V Brumfeld, R Kapon, V Kiss, R Nevo, and Z Reich. Passive and facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled. *J Biol Chem*, 2007.
- [59] EM Renkin. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol*, 1954.