

МУТАЦИИ В ГЕНЕ ЛАМИНА А/С ИЗМЕНЯЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

© А. Б. Малашичева^{1, 2}, А. С. Забирник^{3, 4}, Н. А. Смолина,¹
Е. А. Омельченко,⁴ Р. И. Дмитриева,¹ А. А. Костарева^{1, *}

¹ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург,

² С.-Петербургский государственный университет,

³ Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

и ⁴ Лаборатория клеточных биотехнологий «Virola», Харьков, Украина;

* электронный адрес: akostareva@hotmail.com

Мутации в гене ламина А/С (*LMNA*) приводят к развитию группы тяжелых заболеваний — ламинопатий. Детальный механизм воздействия ламинарных мутаций до сих пор неясен. Так как при ламинопатиях более всего страдают ткани мезенхимного происхождения, в частности жировая, целью исследования было изучить влияние мутаций *LMNA* на процесс дифференцировки мезенхимных стволовых клеток — стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) — в адипогенном направлении. Для этого СКЖТ трансдуцировали лентивирусными векторами, несущими ранее описанные мутации гена *LMNA*, ассоциированные с различными синдромами (миодистрофия, кардиомиопатия, липодистрофия и прогероидный синдром), после чего в клетках индуцировали адипоцитарную дифференцировку. Мы показали, что введение генетических конструкций гена *LMNA* с точечными мутациями *G465D*, *R482L* и *R527C* в разной степени повышало адипоцитарную дифференцировку СКЖТ по сравнению с введением ламина дикого типа, в то время как мутация *R471C* снижала эффективность дифференцировки. Кроме того, продемонстрировано, что введение ламина с мутацией *R471C* или *R527C* существенно повышало уровень экспрессии маркерных генов жировой дифференцировки *PPARG*, *SREBP1* и адипина. Мутации гена ламина А/С обладают сильным, разнящимся между мутациями влиянием на процесс дифференцировки мезенхимных стволовых клеток, что, вероятно, лежит в основе патогенетических изменений тканей, возникающих при ламинопатиях.

Ключевые слова: ламин А/С, ламинопатии, стромальные клетки жировой ткани, дифференцировка, адипогенез.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, СКЖТ — стромальные клетки жировой ткани, *PPARG* — peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *SREBP1* — sterol regulatory element-binding protein 1.

Ядерная ламина — это механическая сеть, поддерживающая структуру ядра, состоящая из промежуточных филаментов — ламинов типов А и В. Две основные изоформы ламинов типа А позвоночных — ламин А и С — являются производными одного гена (*LMNA*) и формируются путем альтернативного сплайсинга (Lin, Worman, 1993).

Хотя ранее предполагалось, что ядерная ламина лишь оказывает структурную поддержку мембранам ядерной оболочки, многие экспериментальные данные указывают на то, что она прямо или косвенно вовлечена во многие ключевые клеточные функции (Prokocimer et al., 2009). Так, ламин А/С взаимодействуют с факторами транскрипции *c-Fos*, *МОК2* и *SREBP1* (Lloyd et al., 2002; Ivorra et al., 2006; Harper et al., 2009). Кроме того, на сегодняшний день показана тесная связь ламинов с эпигенетической регуляцией хроматина, что в свою очередь является одним из путей опосредованной ламинотранскрипции генов (Shumaker et al., 2006; Melcer et al., 2012).

Мутации в гене ламина А/С приводят к развитию группы наследственных заболеваний — ламинопатий. Их можно разделить на заболевания, поражающие преимущественно поперечнополосатые мышцы, жировую или костную ткань, периферические нервы или же множественные ткани в результате формирования прогероидных фенотипов (Vlcek, Foisner, 2007). Эти заболевания вызывают главным образом тканеспецифичные нарушения, несмотря на то что ламин А являются компонентами ядерной ламины всех дифференцированных соматических клеток. В отличие от большинства других видов промежуточных филаментов, где патологическое влияние мутаций тесно связано с изменением механических и интегративных функций, детальный механизм влияния мутаций ламина на развитие патологий до сих пор неясен и, возможно, связан с изменением ядерного сигналинга и транскрипционного процесса.

Недавно была открыта ключевая роль ламинов в клеточной дифференцировке и онтогенетическом развитии тканей (Espada et al., 2008; Scaffidi, Misteli, 2008; Akter

et al., 2009). Было высказано предположение о том, что сопряженные с заболеваниями мутации ламина А нарушают баланс между пролиферацией и дифференцировкой стволовых клеток взрослого организма, что приводит к менее эффективной регенерации тканей и (или) невозможности поддержания дифференцированного состояния (Gotzmann, Foisner, 2006; Vlcek, Foisner, 2007).

Мы предположили, что одним из механизмов развития ламинопатий является нарушение дифференцировки (функционирования) мезенхимных стволовых клеток (или их предшественников) в ткани, для которой характерны нарушения функционирования при этом виде ламинопатий. Для проверки предложенной гипотезы стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ), полученные от здоровых доноров, трансдуцировали векторами, несущими ранее описанные мутации *LMNA*, после чего оценивали способность трансдуцированных культур к адипогенной и остеогенной дифференцировке. Мы показали, что мутации в гене ламина А/С в разной степени меняют способность СКЖТ к дифференцировке в адипогенном направлении.

Материал и методика

Генетические конструкции. На основе вектора, несущего нормальный ген ламина А/С (*LMNA^{wt}*), путем направленного мутагенеза получили 4 генетические конструкции, несущие мутантные формы гена *LMNA* со следующими точечными мутациями: *G465D*, *R471C*, *R482L* и *R527C*. Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, любезно предоставленные D. Tropeo (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland): psPAX2, pMD2.G и pLVTHM. С использованием вышеуказанных плазмид получали концентраты лентивирусов, которые использовали для трансдукции культур СКЖТ.

Культура клеток и их дифференцировка. Для исследования процесса дифференцировки использовали культуры СКЖТ, полученные у здоровых доноров на 3—6-м пассажах по стандартной методике (Zuk et al., 2001). Культуры вели на пластике (Corning, США) в среде α -MEM (ПанЭко) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров и 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Для подтверждения принадлежности полученных культур к МСК на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 6 (Millipore, США) проводили иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител против CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146 и CD166 по стандартной методике (Dominici et al., 2006) Адипоцитарную дифференцировку СКЖТ индуцировали добавлением к стандартной среде культивирования 0.5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона и 1 мкМ инсулина.

Группы исследования и подсчет уровня дифференцировки. В экспериментах использовали интактные клетки, трансдуцированные контрольной плазмидой (несущей GFP), ламином дикого типа (*LMNA^{wt}*) и 4 исследуемыми мутациями (*G465D*, *R471C*, *R482L* и *R527C*). Для получения данных по доле клеток, прошедших дифференцировку в культуре, на основании анализа микрофотографий в трансдуцированных и контрольных клетках индуцировали терминальную адипоцитарную дифференцировку (7, 14 и 21 сут соответственно).

Оценку влияния экспрессии мутантных форм ламина А на дифференцировку СКЖТ проводили двумя путями: 1) анализ массива микрофотографий, полученных на окрашенных специфическим красителем масляным красным (Oil Red O) препаратах культур клеток, с обчетом соотношения областей дифференцированных и недифференцированных клеток с помощью системы MosaiX (Carl Zeiss Microsystems, Германия; фотографии получали при помощи микроскопа «Аксио Обсервер» с объективом LD «A-Plan» 20×/0.3 Ph 1 (Carl Zeiss, Германия) и камеры Camera Jenoptik ProgRes MF (Jeoptec, Германия); 2) анализ экспрессии адипоцитарных маркеров на разных сроках дифференцировки с помощью ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли с помощью TRIzol(r)Reagent. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit. Для количественного анализа изменения уровня экспрессии маркеров адипоцитарной дифференцировки использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени TaqMan. Для последнего использовали 3 маркера адипоцитарной дифференцировки (МАД) — PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1) и адипсин.

В работе использовали следующие реактивы: α -MEM (ПанЭко, Россия); эмбриональная сыворотка коров (Hyclone, США); пенициллин, стрептомицин и TRIzol®Reagent (Invitrogen, США); 3-изобутил-1-метилксантин, дексаметазон, инсулин, масляный красный (Sigma, США); RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва); TaqMan (Applied Biosystems, США). Для статистической обработки данных использовали программу Statistica, графики строили с использованием программы Microsoft Excel. Для статистического анализа данных использовали критерий Стьюдента.

Результаты

Выделенные культуры клеток анализировали с помощью метода проточной цитофлуориметрии на экспрессию стандартной для МСК панели маркеров. По данным иммунофенотипирования, донорские СКЖТ на 3-м пассаже имели следующий фенотип: CD73, CD90 и CD105. Эндотелиальные и гематопозитические маркеры (CD19, CD34 и CD45) присутствовали на фоновом уровне. В исследование были взяты четыре ранее описанные точечные мутации гена ламина А/С, ассоциированные со следующими преобладающими фенотипами: *G465D* — миодистрофии и липодистрофии, *R471C* — кардиомиопатии, *R482L* — липодистрофии, *R527C* — прогероидный синдром. Культуры СКЖТ, полученные от здоровых доноров, были трансдуцированы лентивирусными векторами, несущими эти мутации, с последующей адипоцитарной дифференцировкой. Эффективность трансдукции СКЖТ составляла 82—87 %.

Для анализа влияния мутаций в гене ламина А на процесс дифференцировки СКЖТ была проведена оценка уровня дифференцировки исследуемых культур с помощью программного анализа большого массива микрофотографий культур клеток на терминальной стадии дифференцировки (рис. 1). Нами отмечено усиление эффекта адипоцитарной дифференцировки в 2—3 раза для большинства исследуемых мутаций, за исключением мутации *R471C*.

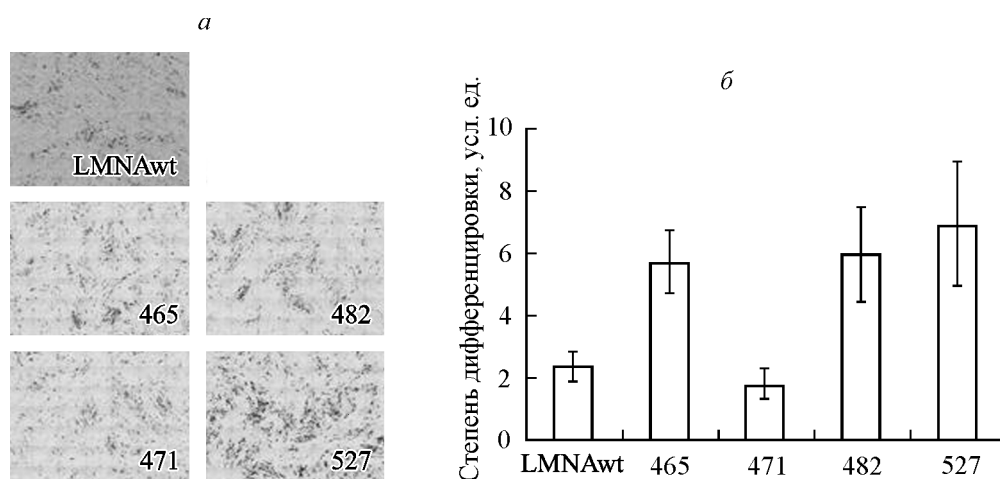


Рис. 1. Анализ влияния мутаций в гене ламина А на дифференцировку стволовых клеток жировой ткани, трансдуцированных контрольным вирусом, несущим ламин дикого типа (*LMNAwt*) и гены ламина с мутациями (обозначены *цифрами*).

a — фотографии клеточных культур, окрашенных масляным красным О, на 14-е сут дифференцировки. 20×, *б* — результаты автоматизированного обсчета массива фотографий: *по вертикали* — относительная эффективность дифференцировки (число дифференцированных клеток на единицу площади), *вертикальные отрезки* — величины стандартного отклонения.

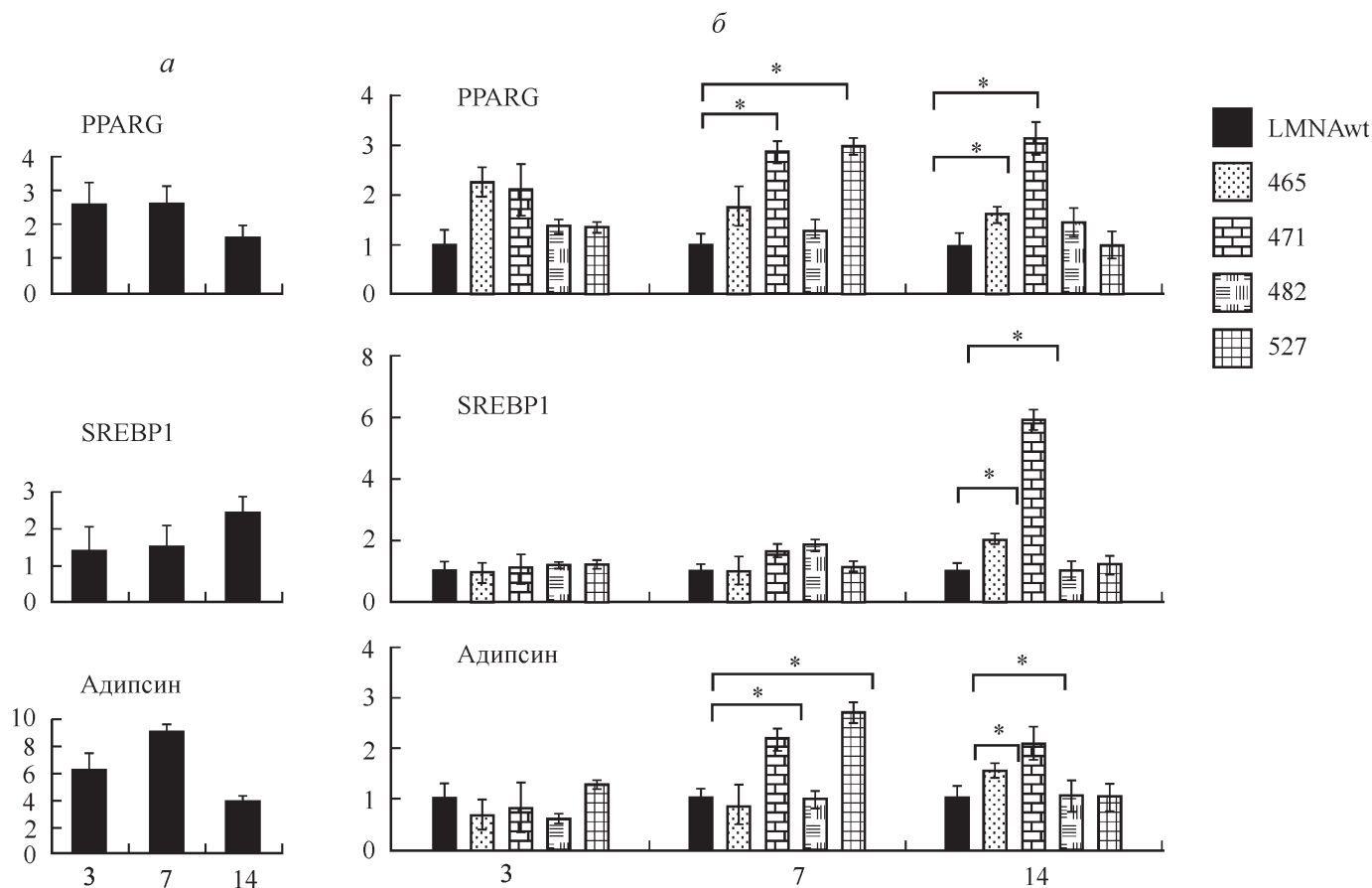


Рис. 2. Анализ влияния мутаций в гене ламина А на экспрессию адипогенных маркеров PPARG, SREBP1 и адипсина на уровне мРНК (количественная ПЦР) при дифференцировке СКЖТ.

a — экспрессия адипогенных маркеров в нормальных клетках при дифференцировке на 3, 7 и 14 е сут дифференцировки соответственно; *б* — экспрессия адипогенных маркеров в трансдуцированных клетках на 3, 7 и 14-е сут дифференцировки, уровень экспрессии нормировался на соответствующий уровень в клетках, трансдуцированных ламином дикого типа (*LMNAwt*) на соответствующие сутки дифференцировки. *По горизонтали цифрами* обозначено время от начала дифференцировки (сут), *по вертикали* — относительный уровень мРНК соответствующего маркера. *Вертикальными отрезками* обозначены величины стандартного отклонения. *Звездочка* — $P < 0.05$.

На следующем этапе работы мы проанализировали уровень экспрессии маркеров адипоцитарной дифференцировки — PPARG, SREBP1 и адипсина (рис. 2). Дифференцировка СКЖТ в адипогенном направлении в присутствии мутантных форм ламина сопровождалась изменениями в экспрессии маркерных генов в клетках по сравнению с клетками, несущими ламин дикого типа (рис. 2). Так, уровень маркера PPARG повышен на всех этапах дифференцировки при всех исследованных мутациях. На уровень экспрессии маркера SREBP1 наибольшее влияние оказывала мутация *R471C* на терминальной стадии дифференцировки. На экспрессию адипсина в ходе дифференцировки также влияли мутации *G465D* и *R471C*. Таким образом, отмечено повышение уровня экспрессии ранних маркеров адипоцитарной дифференцировки на всех исследуемых сроках с наибольшим эффектом, наблюдаемым для мутации *R471C* (рис. 2, б).

Обсуждение

В данной работе нами был проведен анализ влияния различных мутаций гена ламина на процесс дифференцировки СКЖТ в адипогенном направлении. Полученные данные свидетельствуют об усилении адипоцитарной дифференцировки на фоне большинства исследуемых мутаций как на уровне экспрессии генов, так и на морфологическом уровне. Интересно, что наименее выраженное морфологическое влияние на дифференцировку оказывала мутация *R471C*, в то же время именно эта мутация оказывала наибольшее влияние на экспрессию адипогенных маркеров PPARG, SREBP1 и адипсина. Мутация *R471C* ассоциирована с кардиомиопатийным фенотипом, и для нее не было описано вовлечения в патологический процесс жировой ткани. Однако однозначных корреляций между описанным тканевым эффектом исследуемой мутации и влиянием на дифференцировку получено не было, что подтверждает комплексный, многокомпонентный механизм вовлечения ядерных ламинов в регуляцию тканеспецифичной дифференцировки. Наибольшее изменение степени экспрессии генов под воздействием мутантных форм ламинов отмечается для ранних маркеров адипогенной дифференцировки, что согласуется с ранее высказанными предположениями о вовлечении ламинов в наиболее ранние клеточные события, определяющие тканеспецифичность. В связи с этим наименьший эффект исследуемых мутаций на экспрессию позднего маркера адипогенной дифференцировки — адипсина — является закономерным.

Противоречивые на первый взгляд данные о том, что некоторые мутации, в частности *R471C*, фенотипически снижающие дифференцировку, существенно поднимали уровень экспрессии маркеров адипогенной дифференцировки относительно ламина дикого типа, могут трактоваться в свете последних исследований, показывающих активную роль ламина А в организации генома путем специфического связывания больших сегментов генома (Kind, van Steens, 2010). Возможно, исследуемые мутантные формы ламинов утрачивают способность блокировать экспрессию ряда генов, в результате чего в ряде случаев наблюдалась гиперэкспрессия МАД по сравнению с ламин дикого типа. Так, мутации, ассоциированные с липодистрофиями в ламине А/С, вызывают изменения во взаимодействии ассоциированных с хроматином белков с ДНК, таким образом вызывая изменения в организации

хроматина. Указанные клеточные изменения являются специфичными не только для превалирующих синдромов липодистрофий, а характерны в целом для ламинопатий (Capanni et al., 2003; Stierl'e et al., 2003; Muchir et al., 2004). Более детальная расшифровка влияния мутантных форм ламина на процессы тканевой дифференцировки требует проведения дальнейших исследований с изучением их влияния на дифференцировку в миогенном и остеогенном направлениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007—2013 годы» (Госконтракт № 11.519.11.2018 от 21.10.2011) и Федеральной целевой программы «Кадры» (соглашение № 8105 от 23.10.2012).

Список литературы

- Akter R., Rivas D., Geneau G., Drissi H., Duque G. 2009. Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function. *J. Bone Miner. Res.* 24 : 283—293.
- Capanni C., Cenni V., Mattioli E., Sabatelli P., Ognibene A., Columbaro M., Parnaik V. K., Wehnert M., Maraldi N. M., Squarzoni S., Lattanzi G. 2003. Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription. *Exp. Cell Res.* 291 : 122—134.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell. Therapy.* 8 : 315—317.
- Espada J., Varela I., Flores I., Ugalde A. P., Cadinanos J., Pendas A. M., Stewart C. L., Tryggvason K., Blasco M. A., Freije J. M. et al. 2008. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J. Cell Biol.* 181 : 27—35.
- Gotzmann J., Foisner R. 2006. A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? *Histochem. Cell Biol.* 125 : 33—41.
- Harper M., Tillit J., Kress M., Ernoult-Lange M. 2009. Phosphorylation-dependent binding of human transcription factor MOK2 to lamin A/C. *FEBS J.* 276 : 3137—3147.
- Ivorra C., Kubicek M., Gonzalez J. M., Sanz-Gonzalez S. M., Alvarez-Barrientos A., O'Connor J. E., Burke B., Andres V. 2006. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Develop.* 20 : 307—320.
- Kind J., van Steensel B. 2010. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 : 320—325.
- Lin F., Worman H. J. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* 268 : 16 321—16 326.
- Lloyd D. J., Trembath R. C., Shackleton S. 2002. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 11 : 769—777.
- Melcer S., Hezroni H., Rand E., Nissim-Rafinia M., Skoultschi A. I., Stewart C. L., Bustin M., Meshorer E. 2012. Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation. *Nat. Commun.* 3 : 910.
- Muchir A., Medioni J., Laluc M., Massart C., Arimura T., van der Kooij A. J., Desguerre I., Mayer M., Ferrer X., Briault S. et al. 2004. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve.* 30 : 444—450.
- Prokocimer M., Davidovich M., Nissim-Rafinia M., Wiesel-Motiuk N., Bar D. Z., Barkan R., Meshorer E., Gruenbaum Y.

2009. Nuclear lamins: Key regulators of nuclear structure and activities. *J. Cell. Mol. Med.* 13 : 1059—1085.

Scaffidi P., Misteli T. 2008. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* 10 : 452—459.

Shumaker D. K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S. A., Bozovsky M. R., Erdos M. R., Eriksson M., Goldman A. E., Khuon S., Collins F. S. et al. 2006. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 8703—8708.

Stierl'e V., Couprie J., Ostlund C., Krimm I., Zinn-Justin S., Hossenlopp P., Worman H. J., Courvalin J. C., Duband-Goulet I. 2003. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry.* 42 : 4819—4828.

Vlcek S., Foisner R. 2007. Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 : 298—304.

Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7 : 211—226.

Поступила 5 II 2013

LAMIN A/C MUTATIONS CHANGE DIFFERENTIATION POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS

*A. B. Malashicheva,^{1,2} A. S. Zabirnik,^{3,4} N. A. Smolina,¹ E. A. Omelchenko,⁴
R. I. Dmitrieva,¹ A. A. Kostareva^{1,*}*

¹ V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, S.-Petersburg,

² St. Petersburg State University, ³ V. N. Karazin Kharkiv National University

and ⁴ Cell Biotechnology Laboratory «Virola», Kharkiv, Ukraine;

* e-mail: akosrateva@hotmail.com

Mutations in lamin A/C gene (LMNA) lead to development of severe disorders — laminopathies. Unlike most other types of intermediate filaments, where the pathological effect of mutations is tightly linked to alteration of mechanical and integrative functions, the detailed mechanism of lamin mutations is still unclear and possibly involves the alteration of nuclear signaling and transcriptional processes. Since the mesenchymal lineage tissues such as myocardium, skeletal muscle, adipose and bone tissues are mostly affected in laminopathies, the role of lamin A/C in differentiation process of mesenchymal stem cells has been assumed. The aim of the study was to estimate the effect of LMNA mutations of differentiation of mesenchymal stem cells into adipose lineages. *In vitro* mitogenesis was performed on wild type LMNA gene incorporated in a lentiviral vector. Several previously described mutations in LMNA were used, each associated with a certain phenotype. Adipose-derived mesenchymal stem cells from healthy donors were transduced with lentiviruses bearing either wild-type or mutant LMNA. Cells were then induced to adipose differentiation. We show that mutant LMNA/C promotes differentiation capacity of mesenchymal stem cells as seen by morphological changes and by expression of specific adipose markers.

Key words: lamin A/C, laminopathies, stromal cells of adipose tissue, differentiation, adipogenesis.