

РОЛЬ ЯДЕРНЫХ ЛАМИНОВ А/С В ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© М. А. Богданова,^{1, 2} А. Я. Гудкова,¹ А. С. Забирник,^{1, 3, 4} Е. В. Игнатьева,¹
Р. И. Дмитриева,¹ Н. А. Смолина,¹ А. А. Костарева,¹ А. Б. Малашичева^{1, 2, *}

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

² С.-Петербургский государственный университет,

³ Лаборатория клеточных биотехнологий «Virola», Харьков, Украина, и

⁴ Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина;

* электронный адрес: malashicheva_ab@almazovcentre.ru

Ядерные ламины являются основными белками ядерной оболочки и обеспечивают прочность ядерной мембраны клетки. Ранее полагали, что ламины выполняют лишь структурную функцию в клетке, но в последнее время стало понятно, что ламины также участвуют в регуляции экспрессии генов. Ген *LMNA* кодирует ламин А либо С в зависимости от синтезируемой сплайс-формы. Самая известная мутация в гене *LMNA* вызывает тяжелое нарушение развития — синдром преждевременного старения, или прогерия. Это известное заболевание является чрезвычайно редким. В то же время гораздо чаще точечные мутации гена *LMNA*, кодирующего ламин А/С, приводят к так называемым ламинопатиям — заболеваниям, при которых происходит поражение одного из типов тканей преимущественно мезенхимного происхождения. При этом мутации проявляются тканеспецифично — определенные мутации приводят к возникновению всегда одного фенотипа заболевания. Природа этого явления, как и механизмы, посредством которых ламины могут регулировать дифференцировку клеток, остаются слабо изученными. В настоящей работе исследовали влияние различных тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на дифференцировку мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) человека в остеогенном направлении, а также возможное участие в этом процессе сигнального пути Notch. Для этого в ММСК вводили формы *LMNA*, несущие ранее описанные мутации, которые вызывают различные по типу затронутой ткани ламинопатии, и анализировали их влияние на эффективность остеогенной дифференцировки ММСК. Эффективность дифференцировки оценивали по количеству дифференцированных клеток через 21 сут после индукции дифференцировки, а также при помощи оценки уровня экспрессии специфических маркеров остеогенной дифференцировки *SPP1*, *IBSP* и *BGLAP*. Мы показали, что мутации, вызывающие разные типы ламинопатий, по-разному влияют на эффективность остеогенной дифференцировки ММСК, что проявляется на морфологическом уровне и на уровне экспрессии специфических маркеров остеогенной дифференцировки. Одни мутации повышали эффективность дифференцировки, а другие снижали, что свидетельствует о непосредственном участии ламин А/С в регуляции дифференцировки ММСК. Введение мутантных форм *LMNA* в ММСК совместно с введением активированного домена Notch изменяло экспрессию основной мишени сигнального пути Notch — *HEY1*. Таким образом, мутации *LMNA* влияют на взаимодействие ламин А/С с компонентами сигнального пути Notch, и это может являться одним из механизмов влияния этих мутаций на дифференцировку клеток.

Ключевые слова: ламины А/С, остеогенная дифференцировка, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Принятые сокращения: ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ЖТ — жировая ткань, *LMNA* — ламин А/С, *LMNA^{wt}* — ламин А/С дикого типа, *SPP1* — остеооптин, *IBSP* — сиалопротейн, *BGLAP* — остеокальцин.

Ядерные ламины — представители промежуточных филаментов — являются основными белками ядерной оболочки, которые обеспечивают прочность ядерной мембраны клетки (Zuela et al., 2012). Существуют две группы ядерных ламин — А и В. Ламины группы А в отличие от ламин группы В отсутствуют в ранних эмбрионах и начинают экспрессироваться только в процессе дифференцировки клеток. Ламины этой группы состоят из двух изоформ — ламин А и С, являющихся производными одного гена *LMNA* и формирующихся путем

альтернативного сплайсинга (Hutchison, Worman, 2004). В последнее время стало понятно, что ламины А/С играют не только структурную роль в клетке. Так, например, показано взаимодействие ламин с гистонами и ДНК, описано участие ядерных ламин в пространственной организации хроматина и регуляции генов, а также участие ламин в транскрипции и репликации (Dittmer, Misteli, 2011). С помощью белков ядерной мембраны ламины взаимодействуют и с цитоскелетом (Burke, Stewart, 2013). Мутации в гене *LMNA* могут приводить к тяжелым

наследственным заболеваниям — ламинопатиям, самая известная из которых — прогерия, или синдром преждевременного старения. Остальные же ламинопатии выражаются в избирательном дегенеративном поражении различных тканей преимущественно мезенхимного происхождения (Schreiber, Kennedy, 2013). *LMNA* экспрессируется в дифференцированных клетках всех типов тканей, и в связи с этим представляется неясным преимущественное поражение тканей мезенхимного происхождения — мышечной, жировой и костной — при мутациях в гене *LMNA*. Несмотря на большую актуальность исследований в связи с тяжестью течения и неблагоприятным прогнозом большинства ламинопатий, механизмы, посредством которых ядерные ламины вызывают развитие различных на первый взгляд заболеваний с поражением разных систем и органов, остаются нераскрытыми.

Одним из основных сигнальных путей, отвечающих за межклеточную сигнализацию и дифференцировку клеток, является сигнальный путь Notch. Этот сигнальный путь, в частности, регулирует развитие скелета и костной ткани. Было показано, что продукт мутантной формы *LMNA*, вызывающий прогерия, оказывает влияние на функционирование сигнального пути Notch (Scaffidi, Misteli, 2008).

Ранее нами было показано, что мутации в гене *LMNA*, вызывающие различные типы ламинопатий, по-разному влияют на эффективность адипогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных клеток жировой ткани (ММСК) (Малашичева и др., 2013). В настоящей работе мы исследовали влияние мутаций в гене *LMNA* на дифференцировку ММСК человека в остеогенном направлении, а также возможное участие в этом процессе сигнального пути Notch. Для этого в ММСК вводили формы гена *LMNA*, несущие ранее описанные мутации и вызывающие различные типы ламинопатий с преимущественным поражением одного из типов ткани — мышечной, жировой либо костной. Мы показали, что мутации, связанные с разными заболеваниями, по-разному влияют на эффективность остеогенной дифференцировки ММСК. Также мы показали, что одним из механизмов, участвующих в регуляции дифференцировки ММСК, может быть взаимодействие ламинов А/С с компонентами сигнального пути Notch.

Материал и методика

Генетические конструкции. кДНК гена *LMNA* из вектора pCDHblast MCSNard OST-LMNA (Addgene, США) клонировали в лентивирусный вектор pLVTHM (Malashicheva et al., 2007). Затем путем направленного мутагенеза при помощи ПЦР получили 6 генетических конструкций, несущих мутантные формы *LMNA* со следующими точечными мутациями — G232E, G465D, R471C, R482L, R527C и R571C. Лентивирусный вектор, несущий внутриклеточный домен гена *NOTCH1* (NICD), был любезно предоставлен А. Н. Томилиным (Институт цитологии РАН). Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, несущие функциональные гены вируса иммунодефицита человека и гены, необходимые для его сборки, как это было описано ранее (Малашичева и др., 2008).

Культуры клеток и их дифференцировка. В исследовании были использованы культуры ММСК 3—6-го пассажа, полученные от здоровых доноров по ме-

тодике, описанной ранее (Dmitrieva et al., 2012). Культуры клеток вели на чашках Петри (Corning, США) в среде α -MEM (Панэко, Москва) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров (Hyclone, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США) в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Для подтверждения принадлежности полученных культур к ММСК на проточном цитофлуориметре GuavaEasyCyte6 (Millipore, США) проводили иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител против CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146 и CD166 (BD, США) по стандартной методике (Dmitrieva et al., 2012). Для остеогенной дифференцировки к стандартной среде культивирования добавляли следующие факторы: 50 мкМ аскорбиновой кислоты, 1 мкМ дексаметазона и 10 мМ бета-глицерофосфата (Sigma, США).

Трансдукция ММСК. Через 1 ч после посева ММСК в среду культивирования добавляли концентрат вирусных частиц, через 6 ч среду культивирования меняли на свежую. Эффективность трансдукции контролировали при помощи использования вируса, несущего GFP, в параллельных экспериментах, и она составляла 90—95 %.

Подсчет эффективности дифференцировки. В экспериментах использовали интактные клетки, трансдуцированные контрольным вирусом, несущим ген ламина дикого типа (*LMNA*^{wt}) либо ген ламина с одной из 6 исследуемых мутаций (см. выше). В трансдуцированных и контрольных клетках индуцировали остеогенную дифференцировку и анализировали дифференцированные популяции клеток двумя путями.

1. Через 21 сут после индукции дифференцировки клетки окрашивали специфическим красителем, выявляющим отложение фосфата кальция (ализариновый красный; Sigma, США), получали микрофотографии с помощью микроскопа «Аксио Обсервер» с объективом LD «A-Plan» 20X/0.3 Ph (Carl Zeiss, Германия) и камеры Camera Jenoptic ProgRes MF (Jenoptic, Германия) и затем проводили анализ массива микрофотографий с обчислением соотношения областей дифференцированных и недифференцированных клеток с помощью системы MosaiX (Carl Zeiss Microsystems, Германия).

2. Проводили анализ экспрессии остеогенных маркеров на 4, 14 и 21-е сут после индукции дифференцировки с помощью ПЦР в реальном времени.

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США). Реакцию обратной транскрипции проводили, используя RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Для количественного анализа изменения уровня экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия). Для оценки уровня остеогенной дифференцировки использовали специфические маркеры — *SPP1* (остеопонтин), *IBSP* (сиалопротеин) и *BGLAP* (остеокальцин). Влияние мутантных форм *LMNA* на сигнальный путь Notch оценивали при помощи оценки уровня экспрессии гена *HEY1* методом количественной ПЦР. В качестве эндогенного контроля использовали ген *GAPDH*. В работе использовали следующие праймеры:

HEY1 F TGGATCACCTGAAAATGCTG, *HEY1* R CGAAATCCCAAACCTCCGATA, *IBSP* F TGCCACTCACTGCCTTGAGCC, *IBSP* R GAGAAAGCACAGGCCATTCCCA, *BGLAP* F TGGCCGCACTTTGCATCGCT, *BGLAP* R TTGCTGGACTCTGCACCGCT, *SPP1* F GCCACATGGC-

TAAACCTGACCC, *SPPI* R TGTGGTCATGGCTTTC-GTTGGACT, *GAPDH* FAATGAAGGGGTCATTGATGG и *GAPDH* R AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA.

Иммуноблотинг. Для исследования влияния мутантных форм *LMNA* на сигнальный путь Notch ММСК трансдуцировали одновременно вирусом, несущим одну из форм *LMNA* (дикого типа либо мутантную), а также вирусом, несущим домен NICD. Клетки культивировали 4 сут, затем лизировали и подтверждали содержание NICD методом иммуноблотинга по стандартной методике с использованием антител к белку Notch1 (Santa Cruz, США). Использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (BioRad, США). Детекцию осуществляли с помощью системы усиленной хемилюминесценции (Thermo Scientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя на приборе ChemiDoc (BioRad, США). Для статистической обработки данных использовали программу Statistica, графики строили с использованием программы Microsoft Excel.

Определение уровня активации репортерных конструкций. Для определения уровня активации сигнального пути Notch использовали репортерную люциферазную конструкцию 12×CSL-luc (любезно предоставлена проф. U. Lendahl, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция) (Hansson et al., 2010), несущую ген люциферазы под контролем минимального промотора, перед которым находятся 12 сайтов связывания фактора CSL (CBF1/RBP-Jκ), который в свою очередь является непосредственной мишенью связывания активированного домена NICD. В клетки линии 293НЕК вводили репортерную плазмиду CSL-luc методом кальций-фосфатной трансфекции и плазмиду, несущую ген *LMNA* дикого типа либо с одной из исследуемых мутаций. Через 48 ч клетки лизировали и измеряли люциферазную активность на приборе Synergy2 (BioTek, США).

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica, графики строили с использованием программы Microsoft Excel.

В работе использовали следующие реактивы: среда α-MEM (Панэко, Россия); эмбриональная сыворотка коров (Hyclone, США); пенициллин, стрептомицин и реагент для выделения РНК Trizol (Invitrogen, США); аскорбиновая кислота, дексаметазон и бета-глицерофосфат, краситель ализариновый красный (Sigma, США); набор для реакции обратной транскрипции Reveart Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва); набор для ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия); антитела к белку Notch (Santa Cruz, США); вторичные антитела с пероксидазой хрена (Biorad, США); система усиленной хемилюминесценции (Thermo Scientific, США).

Результаты

Оценка влияния мутаций гена *LMNA* на дифференцировку ММСК. Известно, что различные мутации в гене *LMNA* могут приводить к формам ламинопатий, фенотипически различающихся по типу затронутой ткани главным образом мезенхимного происхождения — жировой, костной или мышечной. ММСК наиболее эффективно можно дифференцировать *in vitro* в адипо- и остеогенном направлениях. Ранее нами было показано влияние ламин на процесс дифференцировки ММСК в адипогенном направлении (Малашичева и др., 2013). На первом этапе настоящей работы мы проверили, как мутации *LMNA*, приводящие *in vivo* к поражению разных типов тканей (обуславливающие различные формы ламинопатий), влияют на дифференцировку ММСК в остеогенном направлении. Для этого использовали ММСК жировой ткани здоровых доноров, охарактеризованные с помощью метода проточной цитометрии на стандартные для ММСК маркеры и функциональные свойства (Dmitrieva et al., 2012).

Для оценки влияния мутантных форм *LMNA* на дифференцировку ММСК были созданы лентивирусные конструкции, несущие точечные мутации гена *LMNA*. В ра-

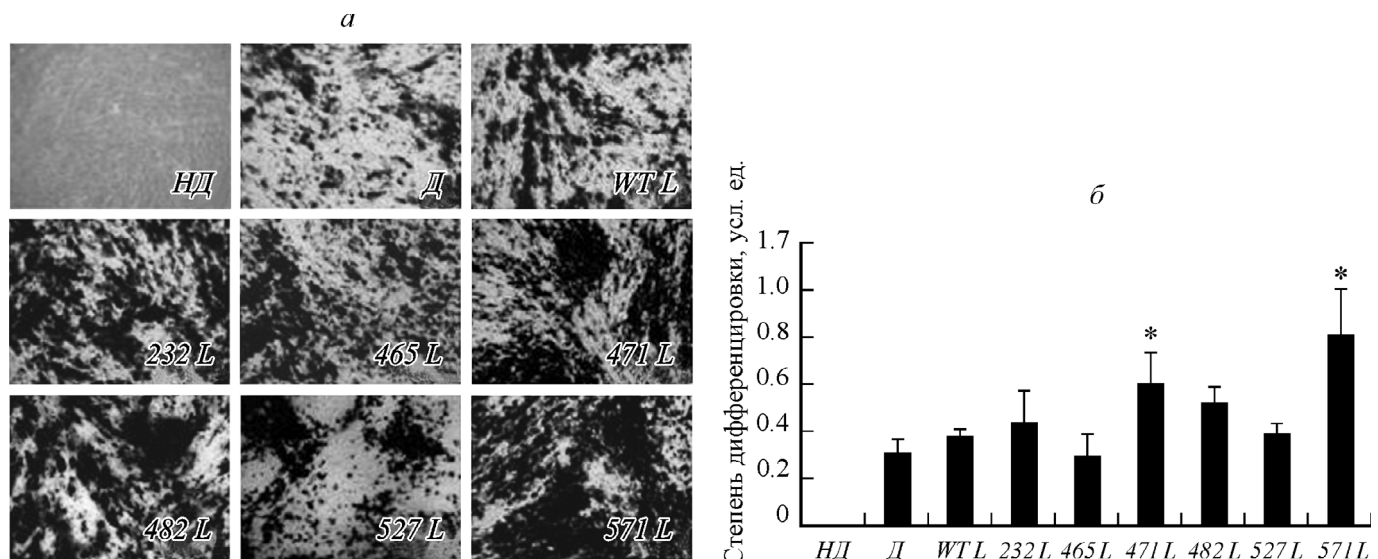


Рис. 1. Влияние мутаций в гене *LMNA* на остеогенную дифференцировку ММСК, трансдуцированных контрольным вирусом, несущим ламин дикого типа (*WTL*) и гены ламин с мутациями (обозначены *цифрами*).

a — фотографии клеточных культур, окрашенных Alizarin Red, на 21-е сут дифференцировки, 20×; *б* — результаты автоматизированного обсева массива фотографий; по вертикали — относительная эффективность дифференцировки (число дифференцированных клеток на единицу площади). Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. Звездочка — $P < 0.05$. HD — недифференцированные клетки, Д — дифференцированные клетки.

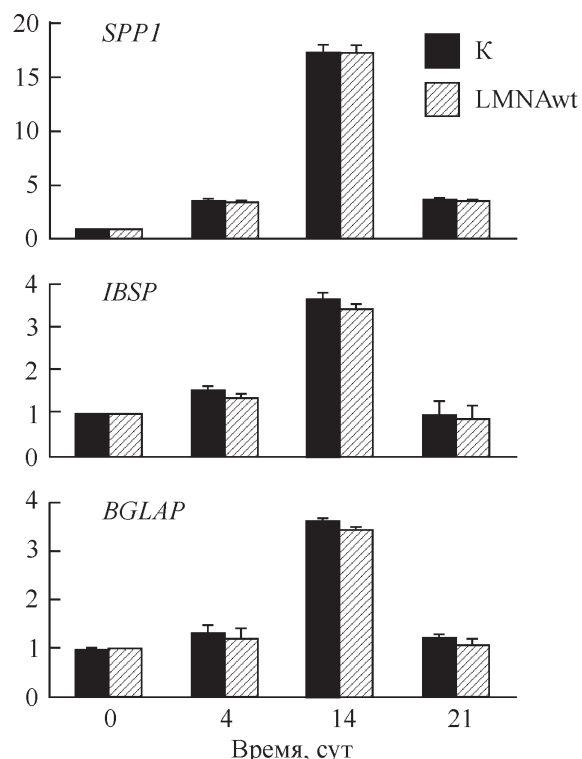


Рис. 2. Сравнение динамики экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки *IBSP*, *BGLAP* и *SPP1* на уровне мРНК (ПЦР в реальном времени) при дифференцировке ММСК без трансдукции (К) и трансдуцированных *LMNA* дикого типа (*LMNAwt*).

По горизонтали — время от начала дифференцировки (0 сут обозначает отсутствие дифференцировки); по вертикали — относительный уровень мРНК соответствующего гена. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения.

боте были использованы мутации, затрагивающие следующие ткани: G232E — мышечную, G465D и R482L — жировую, R471C и R571C — костную. Также была использована мутация (R571C), приводящая к формированию так называемого кардиогенного фенотипа. У пациентов с такой мутацией не отмечается ярко выраженного поражения одной из тканей, но наблюдается выраженная сердечная недостаточность (кардиомиопатия). ММСК трансдуцировали лентивирусами, несущими мутантные формы гена *LMNA* либо *LMNAwt* в качестве контроля. После трансдукции соответствующими вирусами в ММСК индуцировали остеогенную дифференцировку.

Для оценки влияния мутаций гена *LMNA* на процесс дифференцировки ММСК была проведена морфологическая оценка культур (рис. 1, а), а затем оценка уровня дифференцировки исследуемых культур с помощью программного анализа большого массива микрофотографий культур клеток, окрашенных красителем ализариновым красным на 21-е сут дифференцировки. Из данных, представленных на рис. 1, а, видно, что дифференцирующиеся клетки, трансдуцированные вирусами, несущими мутантные формы *LMNA*, морфологически отличаются от контрольных клеток, трансдуцированных *LMNAwt*. При подсчете количества дифференцированных клеток наибольшие отличия от контрольных клеток отмечены для мутаций 471 и 571 (рис. 1, б).

На следующем этапе работы анализировали экспрессию специфических маркеров остеогенной дифференци-

ровки (*SPP1*, *IBSP* и *BGLAP*) с помощью метода ПЦР в реальном времени. Мы проверили, как изменяется экспрессия остеогенных маркеров в ходе дифференцировки ММСК (рис. 2). Для всех трех использованных маркеров было получено достоверное увеличение уровня мРНК соответствующего гена к 14-м сут остеогенной дифференцировки. Для того чтобы оценить влияние вирусной трансдукции на процесс дифференцировки ММСК, мы сравнили экспрессию остеогенных маркеров в клетках с трансдукцией *LMNAwt* и без нее (рис. 2). Увеличение экспрессии маркеров дифференцировки происходит в трансдуцированных *LMNAwt* клетках так же, как и в нетрансдуцированных. Таким образом, введение экзогенного ламина при помощи лентивирусной трансдукции само по себе не оказывает влияния на степень индукции маркеров

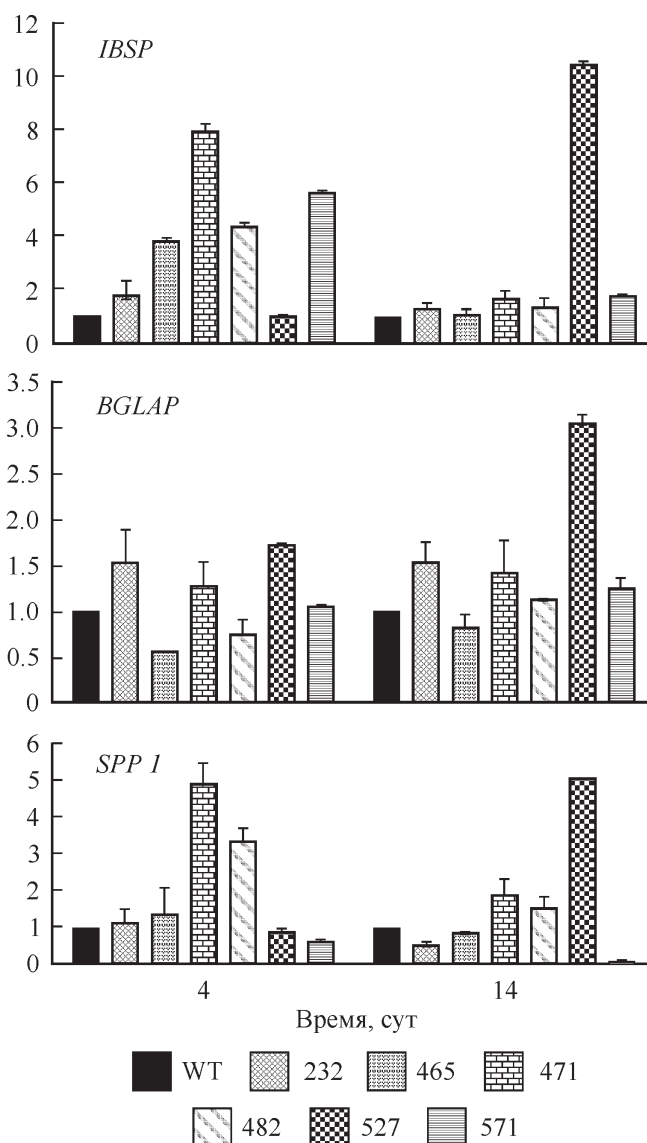


Рис. 3. Влияние мутаций в гене *LMNA* на экспрессию остеогенных маркеров *IBSP*, *BGLAP* и *SPP1* на уровне мРНК (ПЦР в реальном времени) при дифференцировке ММСК.

По горизонтали — время от начала дифференцировки; по вертикали — относительный уровень мРНК соответствующего гена. Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. Звездочка — $P < 0.05$. Уровень экспрессии нормировался на соответствующий уровень в клетках, трансдуцированных ламином дикого типа (WT).

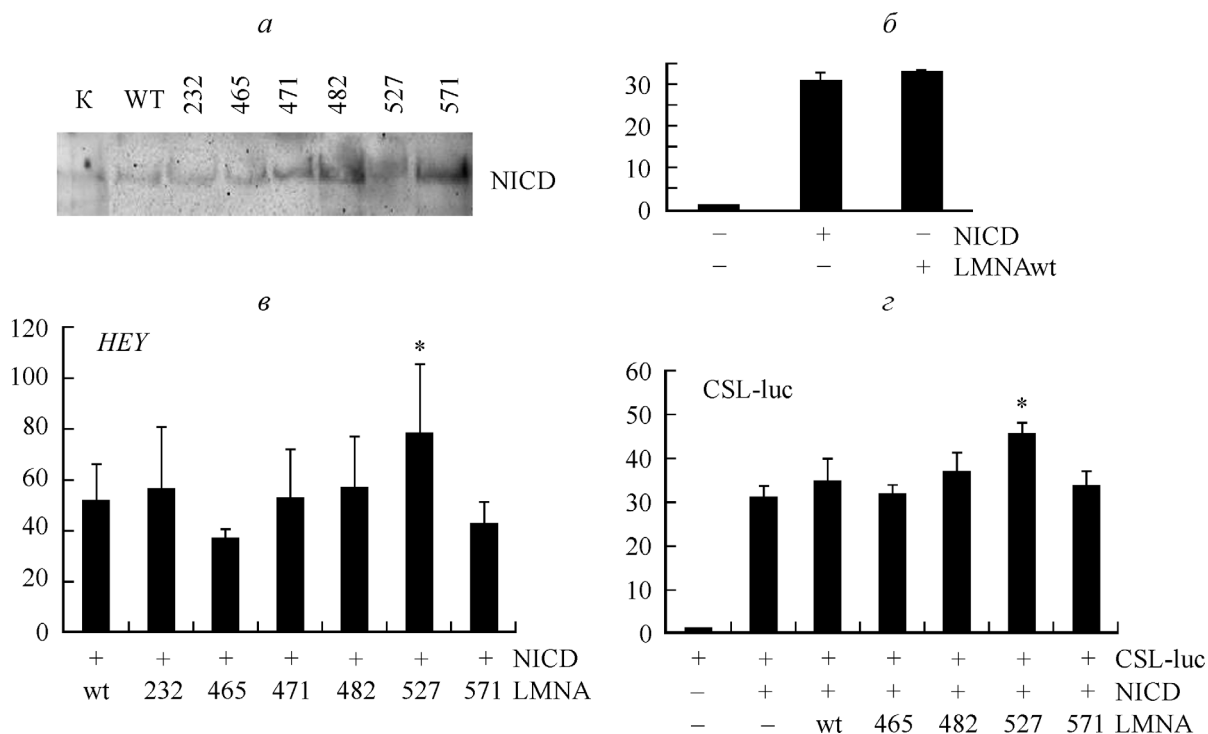


Рис. 4. Взаимодействие ламинов и сигнального пути Notch.

а — выявление экзогенного NICD в MMCK, трансдуцированных контрольной (WT) и мутантными (обозначены цифрами) формами *LMNA*; б — активация экспрессии гена *HEY* в MMCK при введении NICD; по вертикали — относительный уровень мРНК; в — влияние мутаций в гене *LMNA* на экспрессию *HEY* в MMCK при экзогенном введении NICD в клетках, трансдуцированных *LMNAwt* (WT) и генами *LMNA* с мутациями (обозначены цифрами); по вертикали — относительный уровень мРНК; з — влияние мутаций в гене *LMNA* на CSL-зависимую транскрипцию. Клетки линии HEK293 трансфицировали репортерным люциферазным вектором CSL-luc, вектором, несущим NICD, и вектором, несущим *LMNAwt* либо мутантный *LMNA*. По вертикали — люциферазная активность (отн. ед.). Вертикальными отрезками обозначены величины стандартного отклонения. Звездочка — $P < 0.05$. Уровень экспрессии нормировался на соответствующий уровень в клетках, трансдуцированных ламинем дикого типа (WT L).

дифференцировки и может быть применено для дальнейшей оценки введения мутантных форм *LMNA* на эффективность дифференцировки.

Затем мы проверили, как влияют мутантные формы гена *LMNA* на уровень экспрессии маркеров дифференцировки MMCK в остеогенном направлении. Введение мутантных форм *LMNA* в MMCK приводило к изменениям в экспрессии маркерных генов в MMCK по сравнению с клетками, несущими *LMNAwt* (рис. 3). На уровень экспрессии маркера *IBSP* в ходе дифференцировки наибольшее влияние оказали мутации 471, 527 и 571. Уровень маркера *BGLAP* значимо изменялся для всех мутаций. В отношении *SPP1* наибольший эффект усиления экспрессии оказали мутации 471 и 527. В целом полученные результаты говорят о том, что введение мутантных форм *LMNA* оказывает влияние на дифференцировку MMCK, причем для каждой из исследованных мутаций характерны специфические проявления этого влияния.

Следующим этапом работы стало исследование возможных механизмов влияния разных мутаций *LMNA* на остеогенную дифференцировку MMCK. Как упоминалось ранее, одним из важных сигнальных путей, влияющих на процесс дифференцировки клеток, является сигнальный путь Notch, для которого показано участие в процессах дифференцировки мезенхимных стволовых клеток, в частности в остеогенном направлении (Zhu et al., 2008). Однако взаимодействие этого сигнального пути с ламинами практически не изучено. Задачей следующего этапа работы стали оценка возможного взаимодействия ламинов А/С и сигнального пути Notch.

Экзогенное введение активированного домена белка Notch — NICD (NICD-Notch intracellular domain) — служит экспериментальной имитацией активации сигнального пути Notch. Ген *HEY* является основной транскрипционной мишенью мультибелкового комплекса, который собирается в клетке в результате активации сигнального пути Notch (Andersson et al., 2011). В состав этого комплекса входит транскрипционный фактор CSL, который при активации инициирует транскрипцию генов-мишеней Notch. Мы проверили, происходит ли активация сигнального пути Notch в MMCK по уровню активации экзогенное введение *LMNAwt* (рис. 4, б). Результаты, приведенные на рис. 4, б, указывают на то, что NICD активирует экспрессию *HEY* и введение *LMNAwt* не влияет на активацию экспрессии *HEY* в ответ на введение NICD.

Далее мы проверили, как влияет на активацию *HEY* одновременное введение в MMCK домена NICD и мутантных форм *LMNA* (рис. 4, в). Статистически значимое увеличение экспрессии *HEY* происходило только при введении мутации 527. Для того чтобы подтвердить, что наблюдаемое увеличение экспрессии *HEY* действительно происходит за счет транскрипционной активации CSL, мы использовали репортерную люциферазную конструкцию, в состав которой входят 12 CSL-зависимых повторов. Активация гена люциферазы свидетельствует об активации CSL-транскрипции. На рис. 4, з представлены результаты анализа активации CSL-зависимой транскрипции при введении лишь NICD в MMCK и затем при одновременном введении NICD совместно с *LMNAwt*

либо с одной из четырех исследованных мутаций — 465, 482, 527 или 571. Полученные результаты подтверждают, что при введении NICD в ММСК активируется CSL-зависимая транскрипция как в нетрансдуцированных клетках, так и при введении *LMNA^{wt}*. Введение мутантных форм *LMNA* значимо увеличивает CSL-зависимую транскрипцию только при введении мутации 527, тогда как при введении других мутаций значимых различий обнаружить не удалось. Таким образом, полученные данные указывают на то, что мутации в гене *LMNA* могут затрагивать функционирование сигнального пути Notch в ММСК, так что можно говорить о взаимодействии ламинов A/C с компонентами этого сигнального пути.

Обсуждение

Ламины — одни из наиболее хорошо изученных белков, однако многие их свойства остаются неизвестными (Zuela et al., 2012). Так, слабо изученными остаются свойства ламинов по их взаимодействию с путями внутриклеточной сигнализации и участию в определении выбора клеткой одного из возможных путей — продолжения клеточного цикла, запуска процесса дифференцировки или вступления в апоптоз. Особенно важно исследование свойств ламинов A/C, в свете того что мутации гена *LMNA* приводят к серьезным заболеваниям. Ламинопатии, вызванные различными мутациями в генах ламинов, являются «зеркалом» нарушения функций ламинов, а сами мутации — удобным инструментом для исследования тех нарушений, к которым они приводят. В настоящей работе проведена оценка эффективности остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стволовых клеток под влиянием мутаций в гене *LMNA*, связанных с конкретным фенотипом — нарушением развития той или иной ткани.

Полученные результаты показывают, что мутации в разной степени влияют на способность клеток к остеогенной дифференцировке как на уровне экспрессии специфических остеогенных маркеров *SPP1*, *BGLAP* и *IBSP*, так и на морфологическом уровне.

При окраске дифференцированных ММСК мы наблюдали изменения морфологической картины остеогенной дифференцировки ММСК для всех исследованных мутаций, хотя прямой подсчет количества дифференцированных клеток выявил значимые различия лишь для мутаций 471 и 571.

Наибольшее влияние на усиление экспрессии остеогенных маркеров оказали мутации 471 и 527. Степень остеогенной дифференцировки при этих мутациях, затрагивающих костную ткань, увеличивается для всех исследуемых маркеров, что является закономерным. Мутация 465, затрагивающая жировую ткань, оказала наименьшее действие на всех сроках дифференцировки и при всех используемых маркерах; степень остеогенной дифференцировки при этой мутации практически не отличается от дикого типа. Что касается остальных мутаций, их эффект различается в зависимости от используемого маркера. Наибольшее изменение степени экспрессии генов под воздействием мутантных форм ламинов отмечается для ранних маркеров остеогенной дифференцировки (*SPP1* и *IBSP*), что согласуется с ранее высказанными предположениями о вовлечении ламинов A/C в наиболее ранние клеточные события, определяющие тканеспецифичность. Вероятно, что в связи с этим эффект исследуемых мута-

ций на экспрессию позднего маркера *BGLAP* наименее выражен.

В настоящий момент опубликованы данные исследований, проводившихся в направлении изучения роли ламинов A/C в дифференцировке клеток мезенхимного происхождения (Scaffidi et al., 2008; Rauner et al., 2009; Zhang et al., 2011). Несмотря на большой объем и информативность данных, полученных в этих исследованиях, необходимо отметить, что они проводились с использованием siRNA либо нокаутных клеточных линий на мышцах и на иммортализованных первичных культурах от больных прогерией. В первом случае модель изучения основана на полном отсутствии экспрессии ламина в клетках, что не отражает физиологической ситуации, наблюдаемой при ламинопатиях. Во втором случае экспериментальная модель прогерии не может быть экстраполирована на большинство наиболее клинически значимых ламинопатий, поскольку патогенез прогерии связан с нарушением посттрансляционной модификации ламинов, а не с влиянием мутаций на структуру и функцию белка. Таким образом, наше исследование по изучению влияния мутаций гена *LMNA* на процесс дифференцировки ММСК является весьма актуальным.

Снижение уровня экспрессии *LMNA* путем введения siRNA приводит к снижению эффективности остеодифференцировки ММСК у мышей, при этом происходит переключение дифференцировки с остеогенной на жировую (Akter et al. 2009). Показано также, что в организме трансгенных мышей, у которых удален ген *LMNA*, практически не формируется костная ткань. Таким образом, роль ламинов A/C в остеодифференцировке клеток подтверждается работами других авторов, однако влияние спектра мутаций в гене *LMNA* на дифференцировку ММСК ранее не было исследовано. В настоящей и предыдущей (Малашичева и др., 2013) работах при введении разных танеспецифичных мутаций мы не наблюдали какого-то одного эффекта на дифференцировку ММСК. Введенные мутации не выключают функции ламинов A/C, а модифицируют их так, что в случае некоторых мутаций эффективность дифференцировки не только не снижается, но даже увеличивается.

Мы полагаем, что наблюдаемый разный эффект от разных мутаций может говорить о том, что способность клеток к дифференцировке клеток регулируется каким-то балансом ламиновых форм и что нарушение этого баланса может приводить к сдвигу дифференцировки в ту или иную сторону. Вероятно, поэтому разные мутации одного и того же гена приводят к изменению этой способности и как следствие — к разным фенотипам заболевания. Недавно обнаружено физическое взаимодействие ламинов A/C с хроматином (Lund et al., 2013). Показано, что ламины A/C могут взаимодействовать с разными участками хроматина, включая промоторные области, и спектр этого взаимодействия изменяется в ходе дифференцировки (Lund et al., 2013). Таким образом, конкретные мутации действительно могут по-разному включать или выключать действие определенных генов, в том числе и ответственных за дифференцировку, и происходит это, по-видимому, на эпигенетическом уровне. Дальнейшая работа по выяснению этого вопроса на конкретных клеточных моделях поможет прояснить этот вопрос.

Вопрос о том, с какими именно каскадами внутриклеточной сети передачи сигнала взаимодействуют ламины A/C, остается открытым. Так, на модели прогерии была показана активация компонентов сигнального пути Notch

и его транскрипционных мишеней *HEY* и *HES* в ММСК (Scaffidi et al., 2008). В то же время другие авторы также на модели прогерии не смогли подтвердить эти данные (Zhang et al., 2011). Наши результаты говорят в пользу наличия взаимодействия ламин А/С и сигнального пути Notch. Мы показали, что введение мутации 527 приводит к усилению Notch-зависимой транскрипции гена *HEY*. Сигнальный путь Notch является одним из базовых путей межклеточной сигнализации, определяющих выбор клеткой одного из возможных путей — продолжения клеточного цикла, запуска дифференцировки или вступления в апоптоз. Также Notch может определять соотношение стволовых свойств и способности клеток к дифференцировке (Andersson et al., 2011). Мы полагаем, что наши данные о возможности взаимодействия ламин А/С и компонентов этого сигнального пути указывают на то, что изменение способности клеток к дифференцировке при мутациях в гене *LMNA* может происходить при участии Notch. Детали взаимодействия ламин А/С и сигнального пути Notch, а также его влияние на дифференцировку клеток будут служить предметом наших последующих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Кадров» (соглашение № 8105 от 23.10.2012) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01265).

Список литературы

- Малашичева А. Б., Забирник А. С., Смолина Н. А., Омельченко Е. А., Дмитриева Р. И., Костарева А. А. 2013. Мутации в гене ламина А/С изменяют дифференцировочный потенциал стромальных клеток жировой ткани. Цитология. 55 (5) : 313—317. (Malashicheva A. B., Zabornik A. S., Smolina N. A., Dmitrieva R. I., Kostareva A. A. 2013. Lamin A/C mutations alter differentiation potential of mesenchymal stem cells. Tsitologiya. 55 : 313—317.)
- Малашичева А. Б., Канцлер Б., Толкунова Е. Н., Троне Д., Томилин А. Н. 2008. Применение лентивирусов для тканеспецифичных генетических манипуляций. Цитология. 50 (4) : 370—375. (Malashicheva A. B., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. 2008. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. Tsitologiya. 50 : 370—375.)
- 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.
- Andersson E. R., Sandberg R., Lendahl U. 2011. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. Development. 138 : 3593—3612.
- Burke B., Stewart C. L. 2013. The nuclear lamins: flexibility in function. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 14 : 13—24.
- Dittmer T. A., Misteli T. 2011. The lamin protein family. Genome Biol. 2011 (12) : 222. Dmitrieva R. I., Minullina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Anisimov S. V., Zaritskey A. Y. 2012. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. Cell Cycle. 11 : 377—383.
- Hansson E. M., Laner F., Das D., Mutvei A., Marklund U., Ericson J., Farnebo F., Stumm G., Stenmark H., Andersson E. R., Lendahl U. 2010. Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. J. Cell Sci. 123 : 2931—2942.
- Hutchison C. J., Worman H. J. 2004. A-type lamins: guardians of the soma? Nat. Cell Biol. 6 : 1062—1067.
- Lund E., Oldenburg A. R., Delbarre E., Freberg C. T., Duband-Goulet I., Eskeland R., Buendia B., Collas P. 2013. Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes. Genome Res. 10:1580—1589.
- Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. 2007. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. Genesis. 45 : 456—459.
- Rauner M., Sipos W., Goetsch C., Wutzl A., Foisner R., Pietschmann P., Hofbauer L. C. 2009. Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis. J. Bone Miner. Res. 24 : 78—86.
- Scaffidi P., Misteli T. 2008. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. Nat. Cell Biol. 10 : 452—459.
- Schreiber K. H., Kennedy B. K. 2013. When lamins go bad: nuclear structure and disease. Cell. 152 : 1365—1375.
- Wilson K. L., Foisner R. 2010. Lamin-binding Proteins. Cold Spring Harb. Perspect Biol. 2 : a000554.
- Zhang J., Lian Q., Zhu G., Zhou F., Sui L., Tan C., Mutalif R. A., Navasankari R., Zhang Y., Tse H. F., Stewart C. L., Colman A. 2011. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. Cell Stem Cell. 8 : 31—45.
- Zuela N., Bar D. Z., Gruenbaum Y. 2012. Lamins in development, tissue maintenance and stress. EMBO Rep. 13 : 1070—1078.

Поступила 13 XII 2013

NUCLEAR LAMINS REGULATE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

M. A. Bogdanova,^{1, 2} A. Ya. Gudkova,¹ A. S. Zabornik,^{1, 3, 4} E. V. Ignatieva,¹ R. I. Dmitrieva,¹ N. A. Smolina,¹ A. A. Kostareva,¹ A. B. Malashicheva^{1, 2, *}

¹ V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg, ² St. Petersburg State University,

³ Cell Biotechnology Laboratory «Virola», Kharkov, Ukraine, and

⁴ V. N. Karazin Kharkov National University;

* e-mail: malashicheva_ab@almazovcentre.ru

Nuclear lamins are the major proteins of nuclear envelope and provide the strength of nuclear membrane as well as the interaction of extra-nuclear structures with components of cell nucleus. Recently, it became clear that lamins not only play a structural role in the cell, but could also regulate cell fate, for example lamins could influence cell differentiation via interaction with components of the Notch signaling pathway. Human mutations in *LMNA*, encoding lamin A/C lead to diseases commonly referred to as laminopathies. Different mutations cause tissue specific phenotypes that affect predominantly a tissue of mesenchymal origin. The nature of this

phenomenon, as well as the mechanisms by which lamins regulate cell differentiation remain poorly understood. The aim of this study was to investigate the effect of different mutations of the *LMNA* on human mesenchymal stem cell (MSC) osteogenic differentiation, and to explore a possible interaction of lamins and Notch signaling pathway. We modified human MSC with mutant *LMNA* bearing known mutations with tissue specific phenotype associated with different laminopathies. We have shown that mutations associated with different diseases have different effects on the efficiency of MSC osteogenic differentiation and on the expression of specific osteogenic markers *SPPI*, *IBSP* and *BGLAP*. We have also shown that one of the mechanisms involved in the regulation of MSC differentiation may be an interaction of lamins A/C with components of Notch signaling.
