

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *LMNA* НА МИОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПЕРВИЧНЫХ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК ЛИНИИ C2C12

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

¹ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,
³ Университет г. Осло, 0316, Осло, Норвегия;

* электронный адрес: akostareva@hotmail.com

Ядерные ламины образуют ядерную ламину, локализованную под внутренней ядерной мембраной. Ранее считали, что ядерная ламина в основном выполняет структурную роль, однако было показано ее участие в регуляторных процессах, организации хроматина и транскрипции генов. Известно, что мутации в гене *LMNA* ведут к развитию большого числа заболеваний, ламинопатий, при которых преимущественно поражаются ткани мезенхимного происхождения. В настоящий момент механизмы, посредством которых ламины могут регулировать дифференцировку клеток, остаются не до конца изученными. В данной работе мы изучали влияние мутаций в гене *LMNA* на процесс мышечной дифференцировки первичных сателлитных клеток мышцы и клеток линии C2C12. Геном сателлитных клеток и клеток линии C2C12 был модифицирован путем введения лентивирусных конструкторов, кодирующих *LMNA* G232E, ассоциированной с развитием мышечной дистрофии Эмери—Дрейфуса, и *LMNA* R571S, ассоциированной с развитием дилатационной кардиомиопатии. Морфология клеток была оценена с помощью иммуноцитохимических методик, уровень экспрессии генов-маркеров мышечной дифференцировки был проанализирован с помощью ПЦР в режиме реального времени. Мы показали, что анализируемые мутации снижают способность клеток к дифференцировке, а именно к слиянию миобластов и формированию миоотрубок. Был сделан вывод о том, что это происходит вследствие усиленной экспрессии маркеров ранних этапов и сниженной экспрессии маркеров поздних этапов миогенеза. Таким образом, мутации гена ламина могут влиять на процесс мышечной дифференцировки.

Ключевые слова: ядерные ламины, ламинопатии, мышечная дифференцировка, сателлитные клетки, клетки линии C2C12

Принятые сокращения: *LMNA* — ген ламина, *LMNA* G232E — ген ламина с мутацией G232E, *LMNA* R571S — ген ламина с мутацией R571S.

Ядерные ламины относятся к белкам промежуточных филаментов V типа. Ламины преимущественно расположены в периферической части ядра, между внутренней ядерной мембраной и хроматином. Ламины типа A/C экспрессируются почти во всех типах дифференцированных соматических клеток. Ламины кодируются геном *LMNA*, мутации в котором ассоциированы с развитием ламинопатий (Dubinska-Magiera et al., 2013). При развитии ламинопатий чаще всего наблюдают тканеспецифические нарушения, преимущественно поражаются ткани мезенхимного происхождения: поперечно-полосатая мускулатура, жировая и костная ткани. Однако иногда затрагивается сразу несколько типов тканей, что ведет к формированию перекрывающихся и системных фенотипов (Burke, Stewart, 2013; Dubinska-Magiera et al., 2013; de Las Heras et al., 2013).

Согласно структурной гипотезе, мутации в гене *LMNA* нарушают целостность ядерной ламины, что в конечном итоге приводит к снижению способности ядра противостоять механическому стрессу (Lammerding et al.,

2004; Brosig et al., 2010; Sylvius et al., 2011). Гипотеза экспрессии генов позволяет предполагать, что мутации в гене *LMNA* приводят к измененной генной экспрессии во время клеточной дифференцировки. Механизм регулирования экспрессии генов ядерной ламинной основан на прямых взаимодействиях ламин типа A/C с транскрипционными факторами и комплексами моделирования хроматина (Columbaro et al., 2005; Furukawa et al., 2009). Некоторые авторы предполагают «комбинированную» теорию, объединяющую две предыдущие гипотезы, хотя большинство придерживаются гипотезы генной экспрессии (Markiewicz et al., 2006; Furukawa et al., 2009).

На сегодняшний день большой интерес вызывают ламинопатии, поражающие мышечные ткани, а именно мышечная дистрофия Эмери—Дрейфуса и дилатационная кардиомиопатия (Dubinska-Magiera et al., 2013). Развитие ламинопатий часто связывают с нарушением процесса клеточной дифференцировки. Во взрослом организме пулом резидентных стволовых клеток мышечной ткани являются сателлитные клетки, которые расположены меж-

ду сарколеммой и базальной ламиной. В ответ на повреждение и высокую физическую нагрузку сателлитные клетки активируются, начинают активно пролиферировать и дифференцироваться сначала в миообласты, а затем в миоциты, которые сливаются со зрелыми мышечными волокнами или дают начало новым миофибриллам (Morgan, Partridge, 2003; Yin et al., 2013). Эти процессы регулируются теми же генами, что и мышечная дифференцировка в эмбриогенезе (Bentzinger et al., 2010). Процесс мышечной дифференцировки находится под контролем многих генов и транскрипционных факторов (Bentzinger et al., 2012). В нашей работе особое внимание уделено гену *Myomaker*, для которого было показано участие в процессе мышечной дифференцировки и экспрессия на поверхности миообластов во время их слияния (Millay et al., 2013, 2014).

Ранее в Лаборатории молекулярной кардиологии ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова уже было показано влияние мутаций в гене *LMNA* на процесс дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в адипогенном (Малашичева и др., 2013) и остеогенном направлениях (Богданова и др., 2014). Однако мезенхимные стволовые клетки, используемые в качестве модели, оказались малоприменимы для изучения процессов мышечной дифференцировки (Смолина и др., 2014). Поэтому в данном исследовании изучение процессов мышечной дифференцировки проводили с использованием первичных сателлитных клеток мышцы и стабильной клеточной линии мышечных миообластов C2C12.

Целью данной работы являлась характеристика влияния мутаций гена *LMNA* на процесс мышечной дифференцировки первичных сателлитных клеток мышцы и клеток линии C2C12.

Материал и методика

Все исследования проводили в Научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии Научно-исследовательского института молекулярной биологии и генетики Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова.

Объекты исследования. В работе использовали первичные сателлитные клетки мышцы и клетки линии C2C12. Мышей-самцов линии C57BL/6 массой 16–18 г получали из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Клеточная линия C2C12 была любезно предоставлена Институтом цитологии РАН. Для сборки лентивирусов использовали клеточную линию HEK293-T, любезно предоставленную д-ром Н. Алениной (Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Германия).

Трансформация бактерий. Для трансформации использовали бактериальный штамм Top10. Суспензию компетентных клеток инкубировали с 1 мкг плазмидной ДНК в течение 30 мин на льду. Реакцию теплового шока проводили при 42 °С в течение 20 с и затем 2 мин на льду. Далее добавляли 300 мкл прогретой среды LB без антибиотика и инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего 100 мкл суспензии клеток высевали на твердую среду с ампициллином (100 мкг/мл). На следующий день отбирали выросшие трансформанты.

Выделение плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК (пДНК) выделяли методом тахиргер из объема 250 мл жидкой культуры с помощью коммерческого на-

бора HiPure Plasmid Purification Kit (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Производство лентивирусных частиц. кДНК гена *LMNA/C* клонировали в лентивирусный вектор pLVTHM (Malashicheva et al., 2007). Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, несущие пакующие и функциональные гены вируса иммунодефицита человека, как это было описано ранее (Малашичева и др., 2008).

Выделение, культивирование и заражение клеток. Сателлитные клетки выделяли из *m. soleus* самцов линии C57BL/6 и культивировали по описанному ранее протоколу (Смолина и др., 2014). Сателлитные клетки, предварительно обработанные 8 мкг/мл полибрейна (Sigma, Германия), трансдуцировали концентратом вирусных частиц (MOI = 15). Перед посадкой на культуральную поверхность клетки инкубировали в течение 5 мин с вирусным концентратом. Через 16 ч после трансдукции клеткам меняли культуральную среду.

Клетки линии C2C12 культивировали в среде ДМЕМ (Invitrogen, США) с добавлением 10 % ФБС, 1 % L-глутамин (Invitrogen, США) и 1 % пенициллин-стрептомицина (Invitrogen, США) в термостате (37 °С, 5 % CO₂, 99%-ная влажность). Культуральную среду меняли каждые 2 сут.

Индукцию миогенной дифференцировки клеток производили путем замены культуральной среды на дифференцировочную среду (ДМЕМ с добавлением 2 % ЛС, 1 % L-глутамин и 1 % антибиотика (Invitrogen, США)). Перед сменой среды клетки промывали прогретым фосфатным буфером. Клетки дифференцировали в течение 24 ч и 7 сут.

Клетки линии C2C12 были трансдуцированы концентратом вирусных частиц (MOI = 5), через 16 ч после трансдукции культуральная среда была также заменена.

Иммуноцитохимическое мечение клеток. Клетки фиксировали холодным 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при 4 °С. Клетки пермеабелизовали 0.05%-ным раствором Тритона X-100 в фосфатном буфере в течение 5 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой в фосфатном буфере. Блокирование неспецифического связывания производили с помощью 15%-ного раствора ФБС в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего удаляли излишки ФБС. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали следующие первичные антитела: моноклональные мышечные антитела к ламину (*LMNA/C*, Novocastra, Германия) в разведении 1 : 100, моноклональные мышечные антитела к десмину (D33, DAKO, Дания) в разведении 1 : 200 и моноклональные мышечные антитела к тяжелым цепям миозина (MF20, R&D, США) в разведении 1 : 50.

После трех отмывок по 5 мин в фосфатном буфере клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor 488 или AlexaFluor 546 (Invitrogen, США), в течение 45 мин в темноте при комнатной температуре с последующей отмывкой в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Ядра дополнительно окрашивали раствором DAPI в течение 30 с. Визуализацию результатов иммуноцитохимии производили с помощью флуоресцентного микроскопа (Axio Observer, Zeiss, Германия). Для обработки и анализа изображений использовали программу AxioVision.

ПЦР в реальном времени. Из клеток линии C2C12, дифференцированных в миогенном направлении,

Последовательности праймеров, используемых для количественной ПЦР

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
Six1	ATGCTGCCGTCGTTTGGTT	CCTTGAGCACGCTCTCGTT
Pax3	CGATGGCATCCTGAGTGAGC	GCCGTGAAGGTGGTTCTGC
Myf5	AAGGCTCCTGTATCCCTCAC	TGACCTTCTCAGGCGTCTAC
Myomaker	CCTGTGATGGGCTGGTTTGTC	GGTTCATCAAAGTCGGCCAGTGC
MyoD1	CTGCCTTCTACGCACCTGGAC	GGGCCGCTGTAATCCATCATGC
MyoG	GAGACATCCCCCTATTTCTACCA	GCTCAGTCCGCTCATAGCC
Myh4	GGCTGAGGAGGCTGAGGAAC	CTTCTCCACCACCTCCTCCAC
Mrf4	CAGTGGCCAAGTGTTCGGATCA	CTTCTCCACCACCTCCTCCAC
GAPDH	GGATCTGACGTGCCGCTG	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTGC

выделяли РНК с помощью стандартного протокола выделения РНК тризолом (Trizol Reagent, США).

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов Евроген (Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Предварительно образцы обрабатывали ДНКазой.

Для постановки ПЦР в реальном времени использовали 5× реакционную смесь qPCRMix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия). Кроме интеркалирующего красителя в реакции использовали следующие компоненты: кДНК в качестве матрицы (50 нг), прямой и обратный праймеры (10 мкМ каждого) и стерильную воду до конечного объема 25 мкл. Реакцию осуществляли в установке 7500 Real-TimePCR-System (LifeTechnologies, США). Количественную ПЦР проводили в течение 45 циклов. Ход реакции включал в себя преамплификационную 5-минутную денатурацию кДНК при 95 °С, 45 трехэтапных циклов (15-секундная денатурация матрицы при 95 °С, затем отжиг праймеров при 60 °С в течение 30 с, а затем 30-секундная элонгация при 70 °С) и построение кривой плавления (15 с при 95 °С, 1 мин при 60 °С, 30 с при 95 °С, 15 с при 60 °С).

Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени, в качестве метода представления относительной экспрессии гена был использован метод $2^{-\Delta\Delta C_T}$, в качестве референсного гена использовали GAPDH. Последовательности используемых праймеров представлены в таблице.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad, графики строили с использованием программы Microsoft Excel. Данные в результатах представлены в виде среднего значения по всем проведенным экспериментам, указаны стандартные отклонения (SD) или ошибки среднего (SEM) для каждого проанализированного образца. Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Манна—Уитни. Достоверными считали различия при уровнях значимости $p < 0.05$ (*) и $p < 0.01$ (**).

Результаты

Оценка эффективности клеточной трансдукции. Эффективность трансдукции в первую очередь оценивали при помощи лентивируса, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP). Клетки, зараженные вирусным концентратом, экспрессировали GFP уже через

72 ч после заражения. После индукции дифференцировки положительно-трансдуцированные клетки были способны формировать миотрубки, которые также экспрессировали GFP на протяжении всего процесса дифференцировки (рис. 1, а). Эффективность трансдукции составила 95 ± 3 %. В результате иммуноцитохимического окрашивания с антителами против ламина А/С было показано, что экзогенный ламин локализуется в ядре, т. е. процессы трансляции и транспорта белка не нарушены (рис. 1, б).

Целью данной работы было сравнение эффектов гена ламина дикого типа и его мутантных форм на процесс мышечной дифференцировки, поэтому также было важно сравнить эффективность заражения клеток вирусами, несущими гены, кодирующие разные формы ламина. Для этого клетки были заражены вирусами, несущими гены ламина дикого типа и мутантных ламинов, а затем индуцированы к дифференцировке. Оценка положительно-трансдуцированных ядер в клетках не выявила значимых различий в эффективности трансдукции в зависимости от типа ламина, используемого для заражения. Доля положительно-трансдуцированных ядер в случае *LMNA* WT была равна 30.57 % ($n = 105$, где n — число проанализированных миотрубок), в случае *LMNA* G232E — 29.93 % ($n = 99$) и в случае *LMNA* R571S — 46.93 % ($n = 100$) (рис. 1, в). Кроме того, видимых различий в морфологии ядер также зафиксировано не было.

Оценка влияния мутаций гена *LMNA* на морфологию миотрубок. Дальнейшие эксперименты были направлены на оценку влияния мутаций гена ламина (*LMNA* G232E и *LMNA* R571S) на процесс формирования миотрубок первичными сателлитными клетками мыши, выделенными из *m. soleus*. Сателлитные клетки трансдуцировали вирусом, несущим ген ламина дикого типа (*LMNA* WT) или его мутантную форму (*LMNA* G232E или *LMNA* R571S). Затем клетки дифференцировали в среде с низким содержанием сыворотки в течение 7 сут. В процессе дифференцировки наблюдали слияние клеток и формирование миотрубок. Морфологию миотрубок оценивали по результатам иммуноцитохимического окрашивания на десмин и тяжелые цепи миозина (рис. 1, г). В качестве контроля выступали миотрубки, сформированные сателлитными клетками, экспрессирующими экзогенный ламин дикого типа или эндогенную форму ламина (миотрубки, образованные нетрансдуцированными сателлитными клетками).

С помощью иммуноцитохимического мечения показано, что клетки, экспрессирующие мутантные формы ламина, образуют более короткие миотрубки, а также мио-

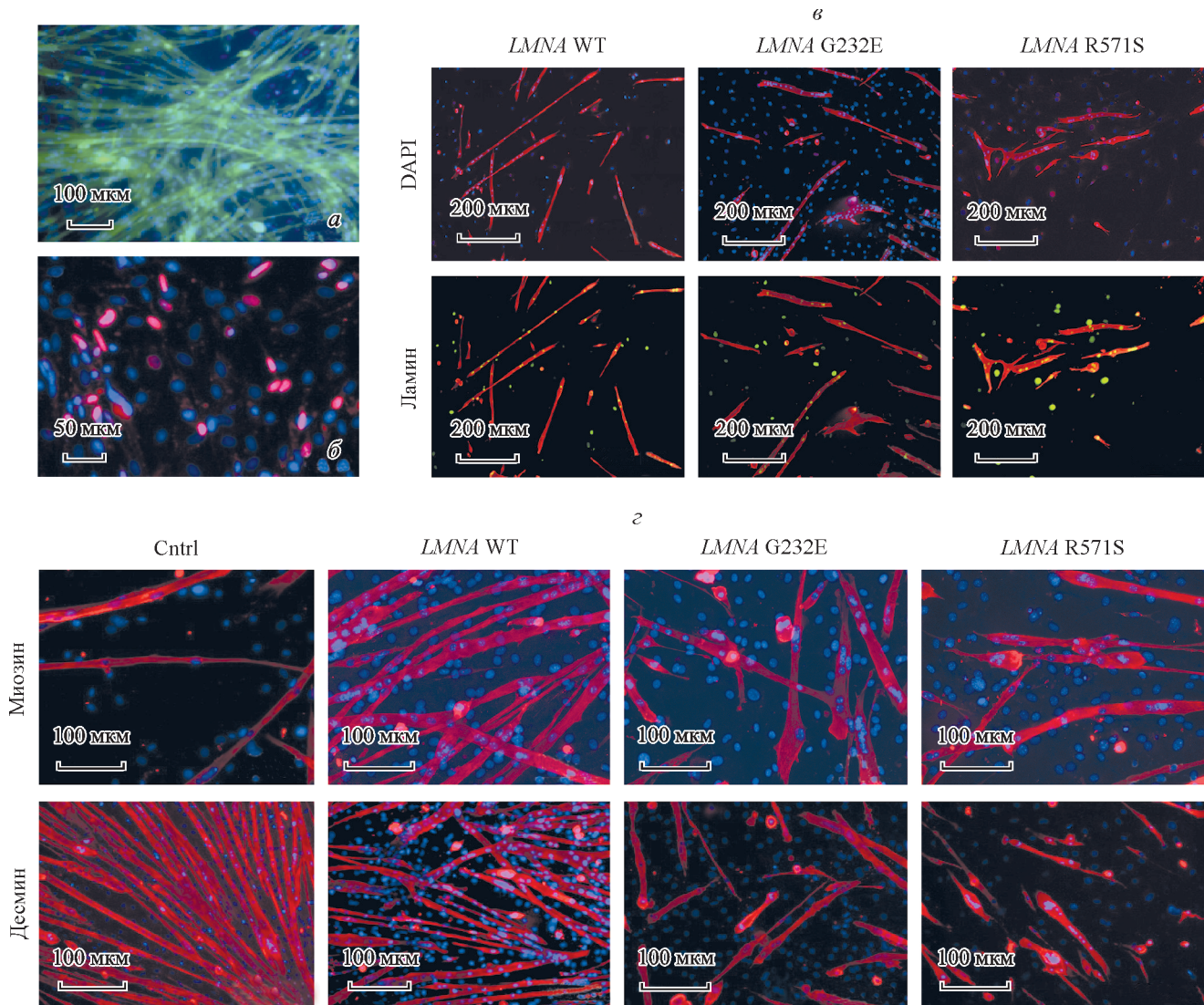


Рис. 1. Миотрубки, образованные миобластами линии C2C12 (*а, б*) и сателлитными клетками мыши, экспрессирующими различные формы ламина (*в, г*), на 7-е сут после индукции дифференцировки.

а — сформированные из положительно-трансдуцированных клеток миотрубки, экспрессирующие GFP. *б* — иммуноцитохимическое мечение миобластов линии C2C12 на ламин A/C (красный цвет); клетки были заражены вирусом, несущим ген человеческого ламина дикого типа с 5 MOI; экзогенный ламин визуализируется в ядре, что подтверждает правильность его синтеза и внутриклеточного транспорта; ядра окрашены DAPI (синий цвет). *в* — иммуноцитохимическое выявление десмина (красный цвет) и ламина A/C (зеленый цвет); ядра окрашены DAPI (синий цвет). *г* — иммуноцитохимическое выявление десмина и тяжелых цепей миозина (красный цвет); ядра окрашены DAPI (синий цвет); можно наблюдать различия морфологии миотрубок, экспрессирующих мутантные формы ламина (*LMNA G232E* и *LMNA R571S*), по сравнению с миотрубками, экспрессирующими эндогенную форму ламина (Ctrl) и ламин дикого типа (*LMNA WT*); мутантные миотрубки характеризуются меньшей длиной и нарушением процесса расхождения ядер к полюсам.

трубки, в которых нарушен процесс расхождения ядер к полюсам.

Для того чтобы дать количественную оценку наблюдаемому явлению, было проведено сравнение размеров миотрубок, сформированных нетрансдуцированными клетками и клетками, экспрессирующими разные формы экзогенного ламина (рис. 2, *а*). Размеры миотрубок оценивали по количеству инкорпорированных в них ядер, в результате этого анализа миотрубки были условно разделены на несколько групп (рис. 2, *а, горизонтальная ось*).

Было показано, что большинство миотрубок (65—70%), экспрессирующих эндогенный ламин или экзогенный ламин дикого типа, включают в себя более 15 ядер. В тоже время 60% миотрубок, экспрессирующих *LMNA R571S*, содержали 5—10 ядер. Миотрубки,

экспрессирующие *LMNA G232E*, включали в себя 1—2 ядра.

Существует два механизма, в результате которых клетки, экспрессирующие мутантные формы ламина, будут неспособны образовывать миотрубки нормальной длины. Во-первых, в клетках может быть нарушен процесс деления, что вызывает снижение скорости пролиферации и снижение суммарного количества клеток; во-вторых, может быть нарушен процесс слияния клеток. Для того чтобы оценить эффективность процесса слияния клеток, определяли индекс слияния, который рассчитывали как выраженное в процентах отношение числа ядер, инкорпорированных в миотрубки, к общему числу всех ядер (рис. 2, *б*). Было показано, что индексы слияния у нетрансдуцированных клеток и клеток, экспрессирую-

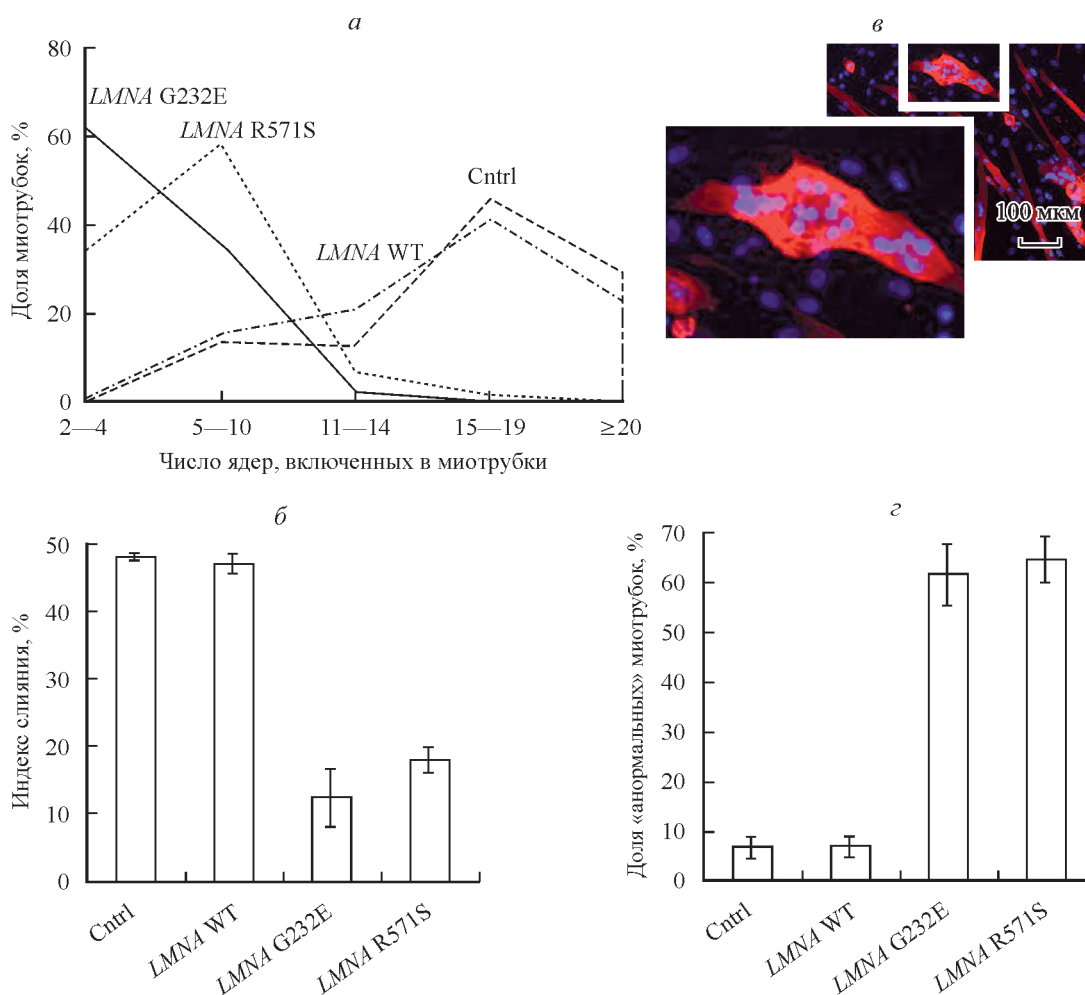


Рис. 2. Морфометрический анализ миотрубок при экспрессии различных форм ламина.

a — процентное соотношение миотрубок разных размеров при экспрессии различных форм ламина; миотрубки, экспрессирующие эндогенный ламина (Ctrl, $n = 120$, где n — число проанализированных миотрубок) и экзогенный ламина дикого типа (*LMNA WT*, $n = 120$), характеризуются большим числом инкорпорированных в них ядер, большая часть клеток содержит 15—19 ядер; миотрубки с мутантной формой ламина *R571S* ($n = 74$) содержат заметно меньшее число ядер (5—10), а с мутантной формой ламина *G232E* ($n = 62$) — еще меньшее число ядер (2—4). *б* — индекс слияния миотрубок, образованных сателлитными клетками, экспрессирующими разные формы ламина; данные представлены в виде средних значений \pm SD; число проанализированных миотрубок (n) для эндогенного ламина (Ctrl) составляет 120, для ламина дикого типа (*LMNA WT*) — 120, для *LMNA G232E* — 62, для *LMNA R571S* — 74. *в* — пример «анормальной» миотрубки, образованной сателлитными клетками, экспрессирующими мутантную форму ламина *G232E*; иммуноцитохимическое выявление десмина (красный цвет); ядра окрашены ДАПИ (синий цвет). *г* — количество «анормальных» миотрубок, сформированных сателлитными клетками, экспрессирующими разные формы ламина; данные представлены в виде средних значений \pm SD; число проанализированных миотрубок (n) для эндогенного ламина (Ctrl) составляет 120, для ламина дикого типа (*LMNA WT*) — 120, для *LMNA G232E* — 62, для *LMNA R571S* — 74.

щих ламин дикого типа, не различались (47.99 ± 0.45 и 46.97 ± 1.49 % соответственно). При этом индексы слияния клеток, экспрессирующих мутантные формы ламина, были значительно ниже — 17.98 ± 1.83 и 12.42 ± 4.24 для *R571S* и *G232E* соответственно. Индекс слияния в случае мутации *G232E* был ниже, чем для мутации *R571S*, хотя статистически это подтверждено не было. Однако эти данные соответствовали результатам анализа размеров миотрубок, т. е. клетки, имеющие наименьший индекс слияния (*G232E*), имели также наименьшую длину (1—2 ядра), а клетки с повышенным индексом слияния (*R571S*) были способны образовывать более длинные трубки (5—10 ядер).

Кроме этого, при анализе морфологии миотрубок, несущих разные формы гена ламина, были обнаружены «анормальные» миотрубки, в которых был нарушен процесс расхождения ядер к полюсам (рис. 2, *в*).

Показано, что количество аномальных миотрубок в случае мутации *LMNA G232E* составляет 61.65 ± 6.23 % от общего числа миотрубок, а в случае мутации *LMNA R571S* — 64.68 ± 4.62 %. Однако количество аномальных миотрубок при экспрессии как эндогенной формы ламина, так и экзогенного ламина дикого типа составляет 6.94 ± 2.16 %, что в 9 раз ниже по сравнению с миотрубками, экспрессирующими мутантные формы ламина (рис. 2, *г*). Таким образом, мутации ламина связаны с нарушением расхождения ядер к полюсам при формировании миотрубок.

Оценка влияния мутаций гена *LMNA* на экспрессию основных генов дифференцировки в миогенном направлении. На следующем этапе работы была произведена оценка влияния мутаций ламина на экспрессию основных генов мышечной дифференцировки — *Six1*, *Pax3*, *Pax7*, *Myf5*, *Myomaker*, *MyoD*,

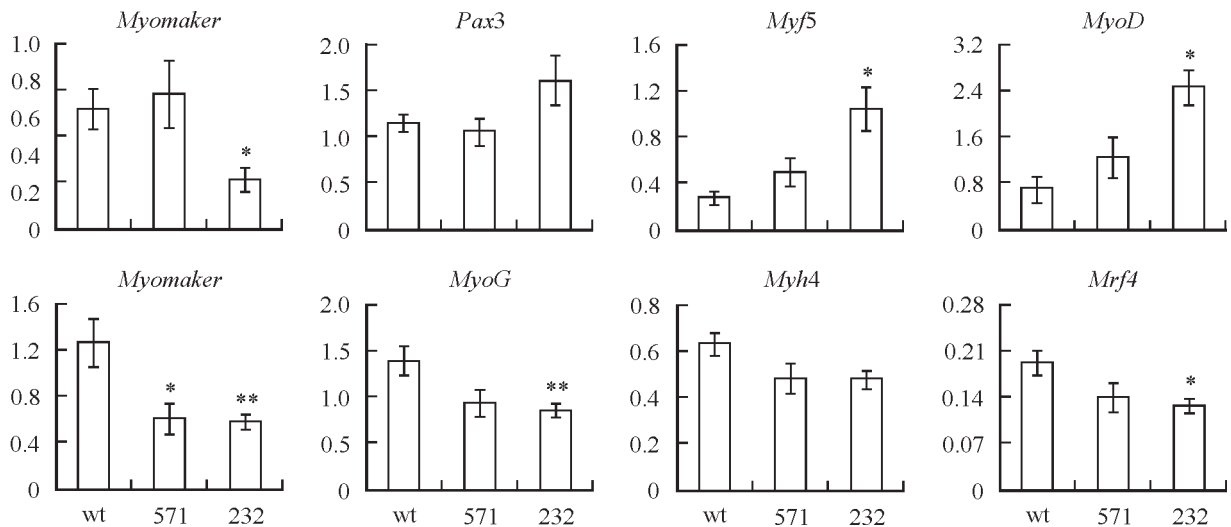


Рис. 3. Динамика экспрессии основных генов миогенеза в миобластах линии C2C12.

По вертикали — относительное количество мРНК для каждого гена, измеренное по методу $2^{-\Delta\Delta C_T}$ и нормированное на образец *LMNA* WT. Данные представлены в виде средних значений по 4–6 биологическим повторам \pm SEM. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$, wt — *LMNA* WT, 571 — *LMNA* R571S, 232 — *LMNA* G232E.

MyoG, *Myh4* и *Mrf4* — с помощью метода ПЦР в реальном времени (рис. 3). На данном этапе эксперименты проводили с использованием миобластов мыши линии C2C12. Клетки линии C2C12 были трансдуцированы лентивирусом, несущим ген ламина дикого типа или его мутантную форму. Дифференцировку клеток проводили в течение 24 ч и 7 сут. Для каждой временной точки и для каждой формы ламина эксперименты были проведены в 4–6 биологических повторах.

Наиболее интересный результат показали данные по экспрессии гена *Myomaker*. При мутации *LMNA* G232E экспрессия гена *Myomaker* была достоверно снижена в 2.4 ($p < 0.01$) и в 2.1 ($p < 0.05$) раза по сравнению с клетками дикого типа для двух временных точек — 24 ч и 7 сут дифференцировки соответственно. Для 7 сут дифференцировки экспрессия *Myomaker* была также снижена в 2.1 раза и для мутации *LMNA* R571S ($p < 0.01$).

Кроме того, были показаны достоверные различия между уровнями экспрессии гена *Myf5* и *MyoD* для клеток, дифференцированных в течение 24 ч. При мутации *LMNA* G232E экспрессия генов *Myf5* и *MyoD* была выше по сравнению с диким типом в 3.9 и 2.7 раза ($p < 0.01$) соответственно. Для клеток с мутацией *LMNA* G232E, дифференцированных в течение 7 сут, также наблюдали достоверное снижение уровня экспрессии поздних маркеров миодифференцировки — генов *MyoG* и *Mrf4*. Экспрессия *MyoG* и *Mrf4* была снижена в 1.6 ($p < 0.05$) и в 1.5 ($p < 0.01$) раза соответственно по сравнению с клетками, экспрессирующими ламин дикого типа.

Обсуждение

В данной работе мы охарактеризовали влияние точечных мутаций гена ламина, ведущих к развитию мышечной дистрофии Эмери—Дрейфуса (*LMNA* G232E) и дилатационной кардиомиопатии (*LMNA* R571S), т. е. затрагивающих скелетную мускулатуру и сердечную мускулатуру соответственно, на процесс мышечной дифференцировки. Для анализа действия мутаций в нашей работе были впервые использованы первичные сателлит-

ные клетки мыши, трансдуцированные лентивирусными конструктами, несущими ген ламина дикого типа или его мутантную форму. Мы показали, что анализируемые мутации снижают способность клеток к дифференцировке, а именно к слиянию и формированию миотрубок. При экспрессии эндогенного ламина и экзогенного ламина дикого типа образующиеся миотрубки содержали 17 ± 2 ядра; при экспрессии экзогенного мутантного ламина количество ядер уменьшалось до 7 ± 3 ядра для *LMNA* R571S и 2 ± 1 ядро для *LMNA* G232E. Дальнейший анализ показал, что формирование коротких миотрубок было связано со сниженным индексом слияния клеток. Индексы слияния у нетрансдуцированных клеток и клеток, экспрессирующих ламин дикого типа, были 47.99 ± 0.45 и 46.97 ± 1.49 % соответственно. Однако индексы слияния клеток, экспрессирующих мутантные формы ламина, были значительно ниже — 17.98 ± 1.83 и 12.42 ± 4.24 для *LMNA* R571S и *LMNA* G232E соответственно. При этом индекс слияния для мутации *LMNA* G232E был ниже, чем для *LMNA* R571S, что согласовывалось с полученными ранее значениями длин миотрубок. Помимо того, что клетки, несущие мутантные формы ламина, имели сниженную способность к слиянию, образованные ими миотрубки часто демонстрировали «анормальную» морфологию, т. е. ядра не расходились к полюсам, как при нормальном процессе миогенеза (Cadot et al., 2012; Yin et al., 2013), но накапливались в центре миотрубки. Таким образом, процесс дифференцировки был нарушен не только на ранних этапах (слияния миобластов), но и на более поздних, когда миотрубка уже сформирована.

Полученные нами результаты по оценке влияния мутаций гена ламина на морфологию миотрубок подтверждают и дополняют имеющиеся литературные данные. Одна из ранних работ была выполнена на культуре клеток C2C12, которые экспрессировали *LMNA* R453W, первую описанную мутацию ламина у больного мышечной дистрофией Эмери—Дрейфуса. В этой работе была продемонстрирована сниженная способность клеток с мутацией *LMNA* R453W к процессу дифференцировки, а именно к формированию многоядерных трубок. Анализ экспрессии генов показал сниженный уровень такого

важного маркера, как *MyoG*, при этом экспрессия более раннего маркера *MyoD* оставалась неизменной (Favreau et al., 2004). Еще одна работа, выполненная на той же клеточной линии, C2C12, и анализирующая ту же мутацию, R453W, также продемонстрировала снижение экспрессии *MyoG*, но не *Myf5* и *MyoD* (Nakelien et al., 2008). Влияние мутаций гена ламина на экспрессию *MyoD* и *MyoG* связано с участием ламина А/С и его партнеров в регуляции сигнальных путей Rb/E2F и Rb/MyoD (Pekovic et al., 2007). С другой стороны, в экспериментах на первичных сателлитных клетках было показано, что клетки, полученные от мышечных нокдаунов по гену *LMNA*, не отличаются по индексу слияния от клеток, полученных от мышечных дикого типа. Миобласты, не имеющие ламина, демонстрировали сниженную скорость пролиферации, а не сниженный индекс слияния, как в нашей работе. Однако эти клетки также имели «анормальную» морфологию ядер миотрубок (Cohen et al., 2013), что соответствовало полученным нами результатам. Это может быть объяснено используемой моделью — видимо, в клетках, полностью лишенных ламина, активируются компенсаторные механизмы, которых нет при экспрессии мутантной формы.

Наши данные по экспрессии гена *Myf5* согласуются с результатами экспериментов, проводимых другими авторами на первичных миообластах мышечных нокдаунов по гену *LMNA*. При отсутствии ламина в клетках экспрессия транскрипционного фактора *MyoD* была снижена, при этом другой транскрипционный фактор *Myf5*, наоборот, имел повышенный уровень экспрессии, маркеры сателлитных клеток *Pax3/Pax7* своего уровня экспрессии не меняли (Frock et al., 2006). Кроме этого, есть работы, в которых авторы анализировали биопсийный материал, полученный от больных с мутацией гена ламина. Сателлитные клетки этих пациентов, так же как и все ранее описанные модели, имели сниженный уровень экспрессии *MyoD*, но при этом количество клеток, экспрессирующих *Pax7*, было увеличено (Park et al., 2009). Эти данные соответствуют полученным нами результатам относительно экспрессии гена *Pax3*.

Таким образом, мутации гена ламина, ассоциированные с развитием скелетно-мышечного фенотипа, ведут к сниженной способности миобластов формировать миотрубки, а также к увеличенной экспрессии ранних маркеров миогенеза и сниженной экспрессии поздних маркеров миогенеза, особенно *MyoG*. Однако в зависимости от анализируемого материала, способа модификации гена ламина и времени клеточной дифференцировки результаты могли варьировать.

В анализе экспрессии основных маркеров миогенной дифференцировки методом ПЦР в реальном времени мы впервые изучили влияние мутаций гена ламина на экспрессию *Myomaker*. *Myomaker* является трансмембранным белком, экспрессирующимся на поверхности мышечных клеток и участвующим в процессе клеточного слияния и формировании многоядерных миофибрилл как в эмбриональном развитии, так и при регенерации во взрослом организме (Millay et al., 2013, 2014). К настоящему моменту до конца неясно, под контролем каких транскрипционных факторов находится *Myomaker*, предположительно это факторы *MyoD* и *MyoG*, так как ген *Myomaker* имеет в своем промоторе последовательность для связывания с транскрипционными факторами типа «спираль—петля—спираль», какими и являются *MyoD* и *MyoG* (Millay et al., 2014). Таким образом, сниженная экспрессия *MyoG* может приводить к сниженной экспрессии *Myomaker*. Тот

факт, что для мутации *LMNA* G232E, затрагивающей мышечную мускулатуру, снижение экспрессии *Myomaker* наблюдается уже через 24 ч после индукции дифференцировки, соответствует данным о меньшей длине миотрубок, образуемых при этой мутации, а также низким значениям индекса слияния клеток. Таким образом, мутация *LMNA* G232E, ведущая к развитию скелетно-мышечного фенотипа, оказывает наибольший негативный эффект на способность миобластов к слиянию и на экспрессию основных маркеров мышечной дифференцировки, что подтверждает тканеспецифичный характер развития ламинопатий.

В результате данной работы мы показали, что мутация гена ламина А/С, ассоциированные с развитием мышечной дистрофии Эмери—Дрейфуса и дилатационной кардиомиопатии, снижают способность миобластов к дифференцировке вследствие изменения уровня экспрессии маркеров миогенеза и трансмембранного белка *Myomaker* — участника процесса слияния миобластов.

Исследование было поддержано РФФИ (грант НК-14-04-01265/1).

Список литературы

- Богданова М. А., Гудкова А. Я., Забирник А. С., Игнатьева Е. В., Дмитриева Р. И., Смолина Н. А., Костарева А. А., Малашичева А. Б. 2014. Роль ядерных ламинов А/С в остеогенной дифференцировке мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. Цитология. 56 (4) : 260—266. (Bogdanova M. A., Gudkova A. Ya., Zibirnik A. S., Ignatieva E. V., Dmitrieva R. I., Smolina N. A., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. 2014. Nuclear lamins regulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Tsitologiya. 56 (4) : 260—266.)
- 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—316. (Malashicheva A. B., Zibirnik A. S., Smolina N. A., Omelchenko E. A., Dmitrieva R. I., Kostareva A. A. 2013. Lamin A/C mutations alter differentiation potential of mesenchymal stem cells. Tsitologiya. 55 (5) : 313—317.)
- Малашичева А. Б., Канцлер Б., Толкунова Е. Н., Троно 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 (4) : 370—375.)
- Смолина Н. А., Давыдова А. Я., Щукина И. А., Карпушев А. В., Малашичева А. Б., Дмитриева Р. И., Костарева А. А. 2014. Сравнительная оценка методов получения функционально активных дифференцированных мышечных клеток. Цитология. 56 (4) : 291—298. (Smolina N. A., Davidova A. Ya., Schukina I. A., Karpushev A. V., Malashicheva A. B., Dmitrieva R. I., Kostareva A. A. 2014. Comparative assessment of different approaches for obtaining terminally differentiated muscle. Tsitologiya. 56 (4) : 291—298.)
- Bentzinger C. F., von Maltzahn J., Rudnicki M. A. 2010. Extrinsic regulation of satellite cell specification. Stem Cell Res. Ther. 1 : 27.
- Bentzinger C. F., Wang Y. X., Rudnicki M. A. 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4 : pii: a008342.
- Brosig M., Ferralli J., Gelman L., Chiquet M., Chiquet-Ehrismann R. 2010. Interfering with the connection between the nucleus and the cytoskeleton affects nuclear rotation, mechanotransduction and myogenesis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 42 : 1717—1728.
- Burke B., Stewart C. L. 2013. The nuclear lamins: flexibility in function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14 : 13—24.

- Cadot B., Gache V., Vasyutina E., Falcone S., Birchmeier C., Gomes E. R. 2012. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep.* 13 : 741—749.
- Cohen T. V., Gnocchi V. F., Cohen J. E., Phadke A., Liu H., Ellis J. A., Foisner R., Stewart C. L., Zammit P. S., Partridge T. A. 2013. Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of Lap2 α . *Hum. Mol. Genet.* 22 : 2852—2869.
- Columbaro M., Capanni C., Mattioli E., Novelli G., Parinaik V. K., Squarzone S., Maraldi N. M., Lattanzi G. 2005. Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson—Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol. Life Sci.* 62 : 2669—2678.
- Dubinska-Magiera M., Zaremba-Czogalla M., Rzepecki R. 2013. Muscle development, regeneration and laminopathies: how lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle development, regeneration and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 70 : 2713—2741.
- Favreau C., Higuete D., Courvalin J. C., Buendia B. 2004. Expression of a mutant lamin A that causes Emery—Dreifuss muscular dystrophy inhibits *in vitro* differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 1481—1492.
- Frock R. L., Kudlow B. A., Evans A. M., Jameson S. A., Hauschka S. D., Kennedy B. K. 2006. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Develop.* 20 : 486—500.
- Furukawa K., Ishida K., Tsunoyama T. A., Toda S., Osoda S., Horigome T., Fisher P. A., Sugiyama S. 2009. A-type and B-type lamins initiate layer assembly at distinct areas of the nuclear envelope in living cells. *Exp. Cell Res.* 315 : 1181—1189.
- Håkkelien A. M., Delbarre E., Gaustad K. G., Buendia B., Collas P. 2008. Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects. *Exp. Cell Res.* 314 : 1869—1880.
- Lammerding J., Schulze P. C., Takahashi T., Kozlov S., Sullivan T., Kamm R. D., Stewart C. L., Lee R. T. 2004. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* 113 : 370—378.
- Las Heras J. I. de, Meinke P., Batrakou D. G., Srsen V., Zuleger N., Kerr A. R., Schirmer E. C. 2013. Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity. *Nucleus.* 4 : 460—477.
- Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. 2007. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis.* 45 : 456—459.
- Markiewicz E., Tilgner K., Barker N., van de Wetering M., Clevers H., Dorobek M., Hausmanowa-Petrusewicz I., Ramaekers F. C., Broers J. L., Blankesteyn W. M., Salpingidou G., Wilson R. G., Ellis J. A., Hutchison C. J. 2006. The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J.* 25 : 3275—3285.
- Millay D. P., O'Rourke J. R., Sutherland L. B., Bezprozvanaya S., Shelton J. M., Bassel-Duby R., Olson E. N. 2013. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature.* 499 : 301—305.
- Millay D. P., Sutherland L. B., Bassel-Duby R., Olson E. N. 2014. Myomaker is essential for muscle regeneration. *Genes Develop.* 28 : 1641—1646.
- Morgan J. E., Partridge T. A. 2003. Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 1151—1156.
- Park Y. E., Hayashi Y. K., Goto K., Komaki H., Hayashi Y., Inuzuka T., Noguchi S., Nonaka I., Nishino I. 2009. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery—Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul. Disord.* 19 : 29—36.
- Pekovic V., Harborth J., Broers J. L., Ramaekers F. C., van Engelen B., Lammens M., von Zglinicki T., Foisner R., Hutchison C., Markiewicz E. 2007. Nucleoplasmic LAP2 α -lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 176 : 163—172.
- Sylvius N., Bonne G., Straatman K., Reddy T., Gant T. W., Shackleton S. 2011. MicroRNA expression profiling in patients with lamin A/C-associated muscular dystrophy. *FASEB J.* 25 : 3966—3978.
- Yin H., Price F., Rudnicki M. A. 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93 : 23—67.

Поступила 6 IX 2016

THE ROLE OF *LMNA* MUTATIONS IN MYOGENIC DIFFERENTIATION OF PRIMARY SATELLITE CELLS AND C2C12 CELLS

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

¹ Federal V. A. Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341,

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034,

and ³ University of Oslo, Oslo, 0316, Norway;

*e-mail: akostareva@hotmail.com

Nuclear lamins form nuclear lamina localized under the inner nuclear membrane. It was previously considered that the nuclear lamina predominantly plays a structural role, however, its involvement have been recently described in the regulatory processes such as chromatin organization and gene transcription. It is known that mutations in the *LMNA* gene lead to the development of a large number of diseases, laminopathies, which mainly affect mesenchymal tissue. Nowadays, the mechanisms by which the lamina can regulate cell differentiation remain incompletely understood. In the present work, we have studied the effect of *LMNA* gene mutations on the process of muscle differentiation of primary satellite cells and C2C12 cell line. The genome of satellite cells and C2C12 cell line was modified by the introduction of lentiviral constructs encoding *LMNA* G232E associated with the development of muscular dystrophy Emery—Dreyfus and *LMNA* R571S associated with the development of dilated cardiomyopathy. The morphology of the cells was estimated using immunofluorescence, the expression level of myogenic genes were analyzed by qPCR. We have shown that the analyzed mutations reduce the ability of cells to differentiate, to fuse and to form myotubes. We have suggested that it is due to enhanced expression of markers at the early stages and to reduced expression markers at the late stages of myogenesis. Therefore, mutations in nuclear lamins can influence the process of muscle differentiation.

Key words: nuclear lamins, laminopathies, muscle differentiation, primary satellite cells, C2C12 cell line