

УДК 575.224.234

МУТАЦИЯ R482L ГЕНА *LMNA* ИЗМЕНЯЕТ ДИНАМИКУ МЫШЕЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ C2C12 И СТИМУЛИРУЕТ ФОРМИРОВАНИЕ ВНУТРИМЫШЕЧНЫХ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ

© 2019 Н.В. Хромова^{1*}, К.И. Перепелина^{1,2}, О.А. Иванова^{1,3},
А.Б. Малашичева^{1,2}, А.А. Костарева¹, Р.И. Дмитриева¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Минздрава России, 197341 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: khromova@almazovcentre.ru,
akostareva@hotmail.com, renata.i.dmitrieva@gmail.com

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург,
Россия; электронная почта: kseniya.perpelina@mail.ru, amalashicheva@gmail.com

³ Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО),
197101 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: astroksana@gmail.com

Поступила в редакцию 12.09.2018

После доработки 16.11.2018

Принята к публикации 16.11.2018

Миссенс-мутации в гене *LMNA*, в результате которых происходят замены высококонсервативного аргинина в положении 482 в С-концевом глобулярном домене ламина А/С, ассоциированы с возникновением семейной парциальной липодистрофии Дюннингана (FPLD2), при которой у пациентов нередко наблюдаются различные нарушения развития мышечной ткани. Механизмы возникновения этих нарушений в настоящее время до конца не определены. Целью нашей работы явилось исследование влияния мутации R482L гена *LMNA* на динамику мышечной дифференцировки и накопление внутримышечного жира с использованием экспериментальной клеточной модели, в которой миобласты мышцы C2C12 были модифицированы лентивирусными конструкциями, несущими ген ламина человека дикого типа *LMNA-WT* и мутацию *LMNA-R482L*. В полученных образцах стимулировали миогенез и адипогенез, исследовали динамику экспрессии маркеров мышечной и жировой дифференцировки, морфологию дифференцированных миотрубок и динамику формирования внутримышечных жировых капель. Мы показали, что в образцах C2C12-*LMNA-R482L* экспрессия десмина повышена на всех этапах мышечной дифференцировки, и миобласты, несущие мутацию, формируют гипертрофированные (по сравнению с C2C12-*LMNA-WT*) миотрубки. Сниженный уровень экспрессии миогенного транскрипционного фактора Myf6 в *LMNA-R482L*-образцах указывал на замедление процессов созревания мышечного волокна. Миобласты, модифицированные мутантным ламином *LMNA-R482L*, в ответ на стимуляцию жировой дифференцировки накапливали жир гораздо активнее, чем миобласты, модифицированные ламином дикого типа, а также экспрессировали маркеры липидных капель: белок, связывающий жирные кислоты 4-го типа (FABP4), жировую триглицеридную липазу (ATGL) и перилипипин 2 (PLIN2). В этой работе мы показали, что мутация R482L гена *LMNA* нарушает динамику мышечной дифференцировки C2C12 и тканеспецифично стимулирует формирование жировых отложений в миобластах и миотрубках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ген *LMNA*, мутация R482L гена *LMNA*, семейная парциальная липодистрофия Дюннингана, миогенез, адипогенез, миобласты C2C12.

DOI: 10.1134/S0320972519030060

Ядерные ламины – это фибриллярные белки, относящиеся к V классу промежуточных филаментов, которые обеспечивают механическую

стабильность структуры ядерной оболочки, а также участвуют в регуляторных процессах, осуществляющих контроль дифференцированного

Принятые сокращения: FPLD2 – семейная парциальная липодистрофия Дюннингана; DMEM – модифицированная Дульбекко среда Игла; DM – дифференцировочная среда; PBS – фосфатно-буферный раствор; WT – дикий тип; MYH3 – эмбриональный миозин; *Myf6* – ген миомейкера/регулятор слияния; FABP4 – белок, связывающий жирные кислоты 4-го типа; ATGL – жировая триглицеридная липаза; PLIN2 – перилипипин 2; BSA – бычий сывороточный альбумин; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; MyoD – миогенный регуляторный фактор D; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

* Адресат для корреспонденции.

состояния постэмбриональных соматических тканей [1]. Большинство дифференцированных соматических клеток экспрессируют ламин А- и С-типов, которые являются альтернативными сплайс-вариантами гена ламина (*LMNA*) [2]. Мутации в гене *LMNA/C* ассоциированы с развитием ламинопатий [3], которые представляют гетерогенную группу наследственных заболеваний с широким спектром клинических проявлений, обусловленных дефектами развития разных типов тканей, преимущественно мезенхимного происхождения, таких как липодистрофия (поражение жировой ткани), мандибулоакральная дисплазия (поражение костной ткани), кардиомиопатия и мышечная дистрофия (поражение сердечной и скелетной мускулатуры) [4, 5]. Кроме того, одновременно могут быть затронуты различные типы тканей, что приводит к возникновению комбинированных фенотипов [6–10]. Каким образом ламинины регулируют молекулярные механизмы, контролируемые клеточную дифференцировку, в настоящее время до конца не ясно. Во многих исследованиях было показано прямое связывание ламининов с ДНК, хроматином, нуклеосомами и гистонами, но физиологическая значимость этих взаимодействий остается нераскрытой [11].

Одним из заболеваний, которое может быть вызвано унаследованными аутосомно-доминантными мутациями гена *LMNA*, является семейная парциальная липодистрофия Дюннингана (FPLD2, OMIM # 151660) [12], для которой характерна прогрессирующая потеря подкожного жира, в основном, в области верхних и нижних конечностей [13]. В большинстве случаев у пациентов с FPLD2 не происходит уменьшение объема межмышечного жира и жира костного мозга, а на лице и в области шеи может наблюдаться избыток жировой ткани [14, 15]. Миссенс-мутации в гене *LMNA*, в результате которых происходят замены высококонсервативного аргинина в положении 482 в С-концевом глобулярном домене ламина А/С, были обнаружены у более чем 80% пациентов с FPLD2 [16, 17]. Известно, что помимо нарушений развития жировой ткани у пациентов с FPLD2 нередко наблюдаются различные нарушения развития мышечной ткани, в т.ч. тяжелые формы мышечной дистрофии или гипертрофия мышечной ткани [17, 18]. Клиническая картина развития мышечной дистрофии у FPLD2-пациентов может различаться: у некоторых пациентов миопатия может проявиться в раннем возрасте, тогда как симптомы FPLD2 появляются только в период полового созревания; также при FPLD2 наблюдается широкий клинический спектр мышечных дисфункций [17, 19].

Молекулярные и клеточные механизмы, связывающие нарушения в развитии/распределении жировой и мышечной тканей при FPLD2, не ясны. Предполагают, что гипертрофия скелетной мускулатуры у пациентов с FPLD2 может быть обусловлена накоплением внутримышечных липидов, неспецифической активацией рецепторов инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1-рецепторов), гиперандрогемией и гиперинсулинемией, но убедительных клинических данных, подтверждающих эти гипотезы, в настоящее время не существует [15, 17, 20].

Описанные факты свидетельствуют о том, что мутация R482L в гене *LMNA* может вызывать нарушения развития двух типов тканей: и жировой, и мышечной. Ранее нами было показано, что в мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани человека [21] и миокарда крысы [22], экспрессирующих белок *LMNA* с мутацией R482L, была подавлена способность к жировой дифференцировке. Целью данной работы явилось изучение влияния мутации R482L гена *LMNA* на динамику мышечной дифференцировки и адипогенной стимуляции миобластов. Для этого мы использовали клеточную модель *in vitro* – генетически измененные миобласты мышцы C2C12. Геном клеток был трансдуцирован лентивирусами, несущими разные формы гена ламина человека. Для получения клеточной модели заболевания в работу были включены два типа миобластов: модифицированные конструкцией, содержащей ген ламин дикого типа (*LMNA/C WT*, контрольная линия), и несущие мутацию R482L этого гена, ассоциированную с FPLD2 [17, 21, 22]. В исследованных клетках стимулировали мышечную и жировую дифференцировку. Кроме того, мы изучали изменение экспрессии маркеров обоих типов дифференцировки, а также морфологию полученных миотрубок и динамику формирования жировых капель в культуре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточная культура и дифференцировка. Мы использовали клеточную линию миобластов C2C12 (ATCC, CRL-1772), которую культивировали с применением модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM; «Gibco», США) с добавлением 20% эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco», США), 1% L-глутамин («Invitrogen», США) и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина («Gibco», США).

Для миогенной стимуляции была взята дифференцировочная среда (DM1), состоящая из DMEM с добавлением 2% сыворотки лошади («Gibco», США), 1% смеси пенициллина и

стрептомицина, 1% L-глутамин. Миогенную дифференцировку индуцировали после достижения культуры клеток субконфлюэнтного состояния.

Среда для адипогенной дифференцировки (DM2) включала в себя DMEM, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% смеси пенициллина и стрептомицина, 1% L-глутамин с добавлением инсулина (5 мг/мл в фосфатно-буферном растворе (PBS), «Sigma», США), розиглитазона (2 мкМ, «Avandia», США), дексаметазона (1 мкМ в этаноле, «Sigma», США) и изобутилметилксантина (0,5 мМ в диметилсульфоксиде (DMCO), «Sigma», США). Запуск адипогенной дифференцировки начинали также при достижении клеточной культуры субконфлюэнтного состояния. Смену дифференцировочной среды производили через день.

С учетом динамики образования миотрубок клетками C2C12 в эксперимент были взяты клеточные культуры на 2-й и 7-й день от момента начала дифференцировки.

Продукция лентивируса и трансдукция. Продукцию лентивируса осуществляли в соответствии с ранее описанным нами протоколом [21]. Субконфлюэнтные клетки линии HEK-293T были трансфицированы одновременно тремя плазмидами: pLVTHM (20 мкг), pMD2.G (5 мкг) и пакующей плазмидой pCMV-dR8.74psPAX2 (5 мкг) с помощью кальций-фосфатного метода. На следующий день производили смену культуральной среды, затем инкубировали клетки еще 24 ч для продукции вируса в более высокой концентрации. Затем лентивирус концентрировали методом ультрацентрифугирования (20 000 g) в течение 2 ч, ресуспендировали в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS (BSA/PBS) и замораживали при -80°C .

Сконцентрированные вирусные частицы добавляли к культуре клеток C2C12 на следующий день после посадки в культуральные плашки, смену среды производили через 24 и 48 ч после трансдукции (при трансфекции с целью повышения эффективности в культуральную среду был добавлен полибрен из расчета 1 мкл/мл среды). Эффективность трансдукции оценивали в параллельном эксперименте с использованием иммуноцитохимического окрашивания и выражали как процент ядер, окрашенных антителами к ламину человека, которые не проявляют кросс-реактивности с ламинном мыши, от общего числа ядер.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили для определения белка ламин (LMNA). Из культуральной посуды удаляли среду для культивирования, затем проводили отмывку фосфатным буфером в течение 3–5 мин, после чего фикси-

ровали образцы 4%-ным раствором параформальдегида в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем образцы дважды отмывали PBS и инкубировали с 0,2%-ным раствором Triton X-100 («Sigma», США) в PBS в течение 2 мин для пермеабиллизации. После этого клетки дважды отмывали PBS. Для блокировки неспецифического связывания антител клетки были инкубированы в 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотке («Gibco», США) в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем из культуральной посуды удаляли раствор эмбриональной бычьей сыворотки и вносили растворы первичных мышечных антител в 1%-ной эмбриональной бычьей сыворотке на фосфатном буфере с 0,05% Tween-20, инкубация длилась 1 ч при комнатной температуре. После инкубации с первичными антителами клетки дважды отмывали PBS. Раствор вторичных антител в 1%-ной эмбриональной бычьей сыворотке на PBS, конъюгированных с флуорохромами Alexa-488 или Alexa-546, был добавлен к культуре клеток и инкубирован 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем следовала трехкратная отмывка PBS. Для визуализации хроматина клетки были инкубированы в течение 60 с в растворе 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) («Sigma», США) на PBS (1 : 10 000), затем однократно отмывали PBS. Для флуоресцентной микроскопии к образцам добавили тонкий слой PBS. Клеточные образцы, выращенные на покровных стеклах, были заключены в среду Fluoromount («Sigma», США) на предметных стеклах. Микроскопический анализ проводили на приборе Axio Observer («Zeiss», Германия).

Окрашивание Oil Red. Через 5–7 дней после индукции адипогенной дифференцировки клетки окрашивали специфическим жирорастворимым красителем Oil Red («Sigma», США). Для окрашивания клеток сначала удаляли среду и дважды промывали лунки с клетками холодным PBS, фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем дважды отмывали клетки водой, далее инкубировали с 60%-ным изопропанолом в течение 5 мин, после чего инкубировали с красителем Oil Red в течение 30–60 мин, после чего краситель удаляли, промывали лунки водой. Окрашенные образцы фотографировали.

Определение морфологических параметров миотрубок. Размер миотрубок определяли количественно, измеряя их ширину в поперечном сечении и длину в продольном сечении. Размеры оценивали для 100 ± 20 миотрубок не менее чем на 5 микрофотографиях с помощью программного обеспечения NIH ImageJ. Анализ проводили «вслепую» без маркировки условий стимуляции.

Количественная ПЦР. РНК из культуры клеток была выделена с использованием набора Extract RNA («Евроген», Россия). Обратную транскрипцию общей РНК (500 нг) проводили с помощью набора MMLV RT Kit («Евроген», Россия). Для постановки ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали $\times 5$ реакционную смесь qPCRMix-HS SYBR + HighROX («Евроген», Россия), приготовленную в соответствии с протоколом и содержащую помимо интеркалирующего красителя SYBR Green следующие компоненты: кДНК в качестве матрицы (5 мкл), прямой и обратный праймеры (1 мкл каждого) (таблица), а также стерильную воду до конечного объема 25 мкл. Реакцию проводили на приборе 7500 Real-Time PCR System («Life Technologies», США). Для нормализации уровня экспрессии исследуемых генов использовали ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH), так называемый ген «домашнего хозяйства». Изменение уровня экспрессии генов оценивали как кратность различий с использованием метода сравнения $\Delta\Delta CT$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание экспериментальной клеточной модели исследования. В исследовании использовали генетически модифицированные миобласты линии C2C12. Для модификации генома использовали трансдукцию лентивирусными конструкциями, несущими разные формы ламина человека: ламина дикого типа (WT) и ламина, несущего мутацию R482L, ассоциированную с FPLD2. Эффективность трансдукции и процессов трансляции, полимеризации и внутриклеточного транспорта кодируемого вирусом белка в модифицированных клетках подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием антителами, специфичными к ламину человека, которые не проявляют кросс-реактивности с ламинном мыши. В среднем, эффективность трансдукции между WT- и R482L-конструкциями существенно не различалась и составляла (25 ± 3) и (23 ± 4)% соответственно (рис. 1, а). Нарушения организации хроматина в клетках C2C12, экспрессирующих мутантную форму ламина человека R482L, хорошо детектировались и выражались в изменениях структуры внутриядерных агрегатов ламина (рис. 1, б).

Чтобы убедиться в том, что трансдукция сама по себе не оказывает существенного воздействия на основные функциональные свойства миобластов C2C12, мы стимулировали миогенную дифференцировку в контрольных образцах клеточной линии и в образцах, трансдуцирован-

ных лентивирусной конструкцией, несущей человеческий ламин дикого типа (WT), и сравнили динамику экспрессии регуляторов и маркеров мышечной дифференцировки в исходном и генетически модифицированном образцах клеточной линии (рис. 1, в и г). Динамика экспрессии маркеров миогенеза в контрольных и в трансдуцированных образцах C2C12 различалась. Так, культуры C2C12-LMNA-WT демонстрировали стабильную динамику экспрессии маркеров эффективной мышечной дифференцировки: регулятора этапа слияния миобластов, гена миомейкера (*Myomk*); и миозинов, экспрессия которых повышается на более поздних этапах развития мышечного волокна, эмбрионального миозина MYH3, изоформы быстрого миозина MYH1 и медленного миозина MYH7 (рис. 1, г). Кроме того, они стабильно дифференцировались с формированием хорошо различимых миотрубок (рис. 1, в). К сожалению, в данных экспериментальных условиях мы не наблюдали поперечнополосатую исчерченность миотрубок, характерную для морфологически зрелого мышечного волокна. Этот недостаток не явился для нас неожиданным, поскольку незрелость миотрубок, полученных в ходе миогенной дифференцировки, является хорошо задокументированным недостатком клеточной модели C2C12 [23].

Праймеры, использованные в работе

Мишень	Последовательность 5'–3'
<i>MYH1</i>	Fw GCTGAGAGAAGCTACCACATT Rv ACAAAGGCGTAGTCGTATGG
<i>MYH3</i>	Fw CTATGCCACCTTCGCTACAACAG Rv CAGTGCAGAGACGGTTTGGAAGG
<i>MYH7</i>	Fw TGCCCGATGACAAAGAAGAG Rv GTCACCGTCTTGCCATTCT
<i>Myomaker</i>	Fw CCTGTGATGGGCCTGGTTTGTCTC Rv GGTTTCATCAAAGTCGGCCAGTGC
<i>Desmin</i>	Fw CCTACACCTGCGAGATTGATGCC Rv GCTCCCTCATCTGCCTCATCAG
<i>ATGL</i>	Fw CCACTTTAGCTCCAAGGATGAG Rv TTGGAGGGTAGGAGGAATGA
<i>FABP4</i>	Fw CACCGAGATTTCTTCAAACCT Rv CCCGCCATCTAGGGTTAT
<i>Myf6</i>	Fw CCAAGTGTTCGGATCATTCCAGG Rv GGAGGCTGAGGCATCCACG
<i>mGapdh</i>	Fw GGATCTGACGTGCCGCCTG Rv GAAGGTGGA AGAGTGGGAGTTGC

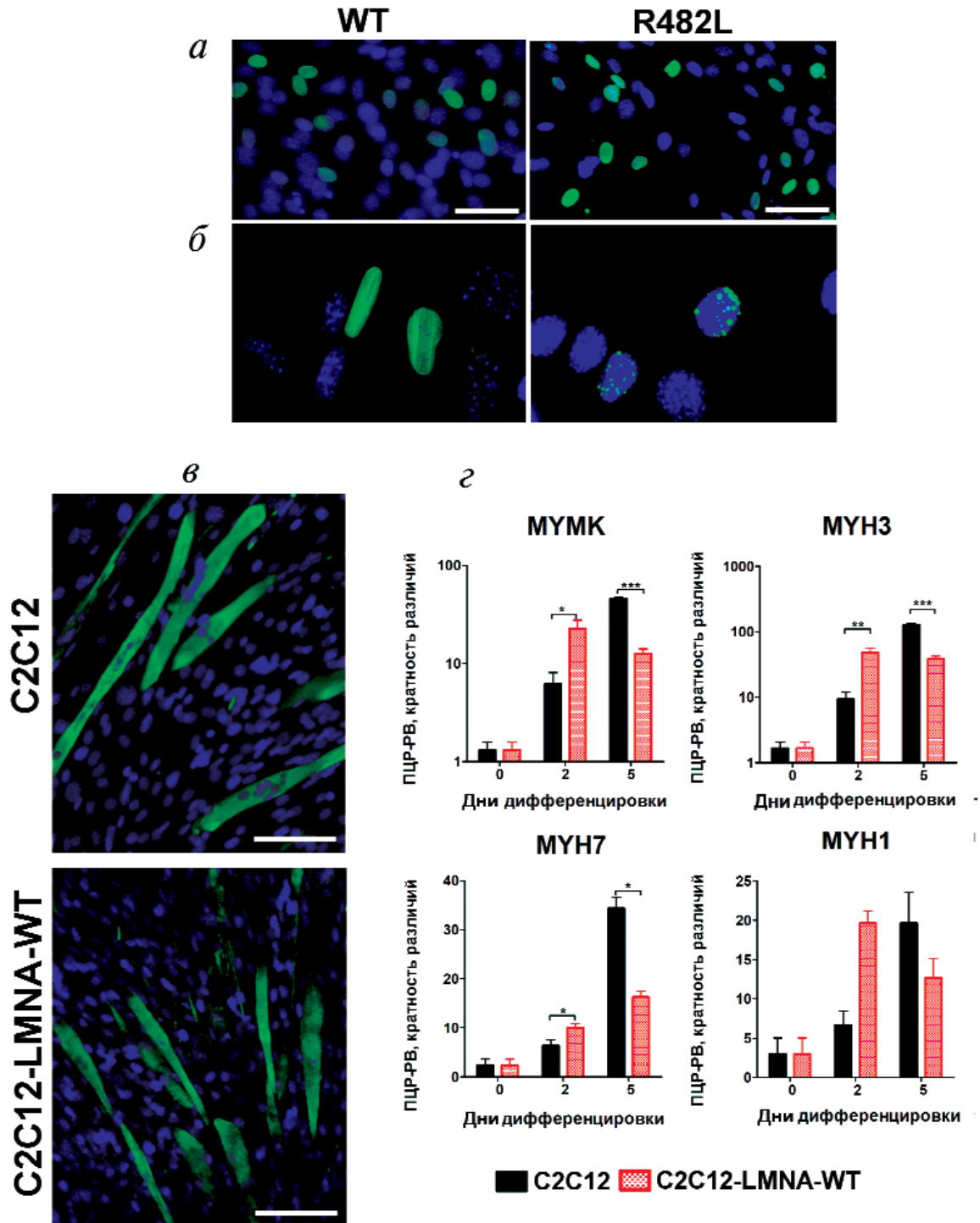


Рис. 1. Описание экспериментальной модели исследования. *a* – Репрезентативные фотографии экспрессии белков LMNA дикого типа (WT), а также несущих мутацию R482L в клетках C2C12 для подтверждения эффективности трансдукции; *б* – нарушения организации хроматина в клетках C2C12, экспрессирующих мутантную форму ламина, выражаются в изменениях структуры внутриядерных агрегатов; клетки окрашены антителами специфичными к LMNA человека (зеленое окрашивание). Ядра визуализированы окрашиванием DAPI (синий). Длина масштабной линейки – 50 мкм; *в* и *г* – клеточная модель мышечной дифференцировки: *в* – контрольная (C2C12) и трансдуцированная (C2C12-LMNA-WT) культуры стабильно дифференцировались с формированием хорошо различимых миотрубок; миотрубки окрашены антителами к десмину, ядра визуализированы окраской DAPI (синий). Длина масштабной линейки – 100 мкм; *г* – динамика экспрессии маркеров поздних этапов мышечной дифференцировки: регулятора слияния миобластов (MYMK), эмбрионального миозина (MYH3), быстрого миозина (MYH1) и медленного миозина (MYH7). Результаты представлены как среднее значение \pm SEM ($n > 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Несмотря на это, а также на различия между группами, мы пришли к выводу, что полученная экспериментальная модель может быть успешно использована для решения задач, предусмотренных в нашем исследовании, т.к. регуляторные события, связанные с выбором направления дифференцировки клетки-предшественни-

ка после стимуляции, происходят на ранних этапах этой дифференцировки.

Морфологические и функциональные различия между миотрубками, полученными после стимуляции мышечной дифференцировки в образцах C2C12-LMNA-WT и C2C12-LMNA-R482L. Анализ морфологических особенностей миотрубок

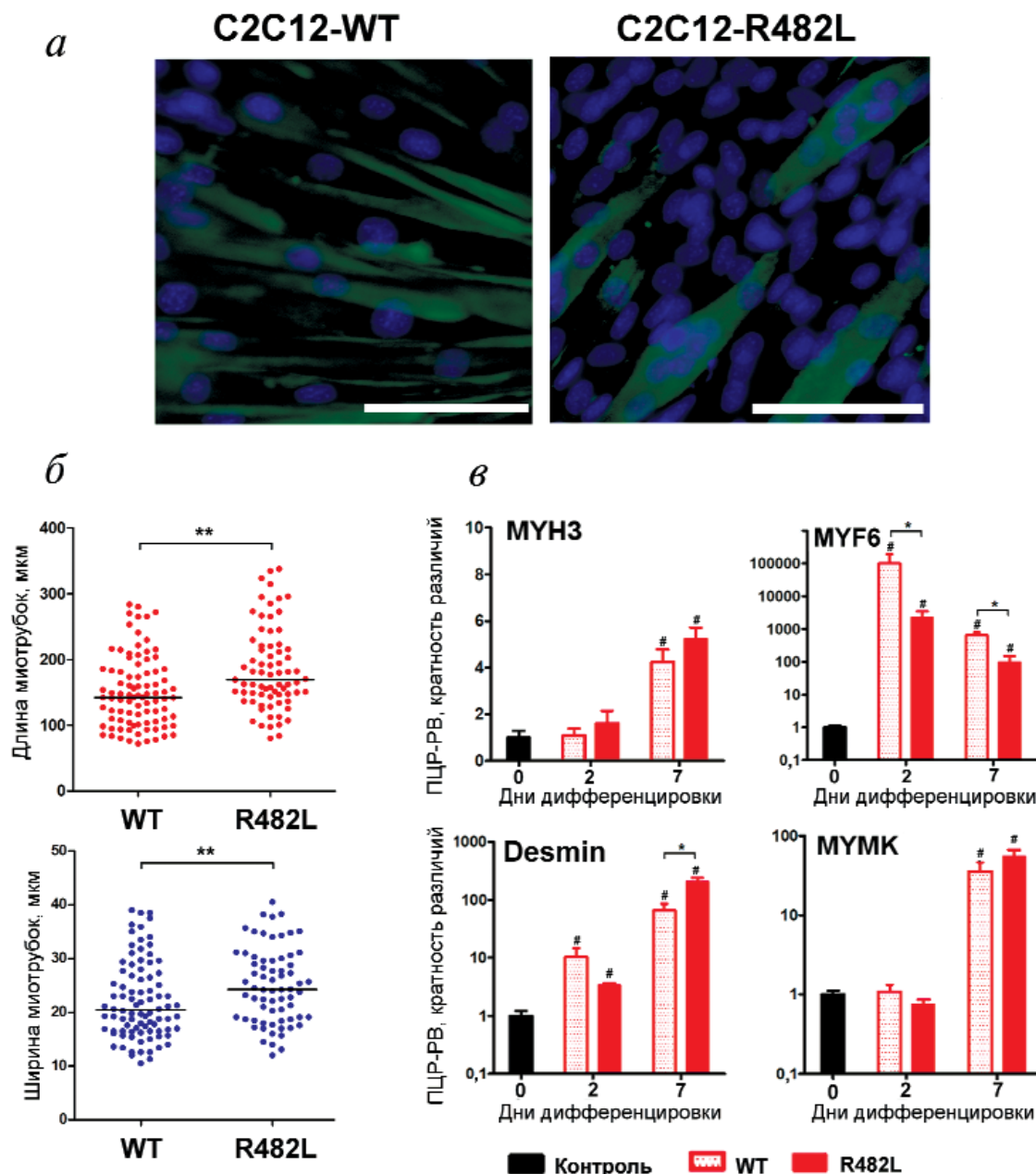


Рис. 2. Морфологические и функциональные особенности миотрубок, полученных при стимуляции мышечной дифференцировки в культурах C2C12-LMNA-WT и C2C12-LMNA-R482; *а* – миотрубки, сформированные в результате дифференцировки генетически модифицированных миобластов C2C12. Миотрубки окрашены антителами к десмину, ядра визуализированы окрашиванием DAPI (синий). Длина масштабной линейки – 50 мкм; *б* – морфологические характеристики дифференцированных миотрубок: длина (красный маркер) и ширина (синий маркер), ** $p < 0,01$; *в* – динамика экспрессии маркеров дифференцировки: десмина (Desmin), регулятора слияния миобластов (MYMK), эмбрионального миозина (MYH3), миогенного фактора (MYF6). Результаты нормализованы на контрольное значение, рассчитаны и представлены как среднее значение \pm SEM (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$ по сравнению с уровнем экспрессии в контрольном образце)

был проведен на 5-й день после стимуляции мышечной дифференцировки контрольных образцов миобластов C2C12 и трансдуцированных образцов. Миотрубки были визуализированы с использованием иммуоцитохимического окрашивания антителами к десмину (рис. 2, а), после чего были измерены длина и ширина дифференцированных миотрубок. Мы обнаружили, что C2C12-миобласты, несущие мутацию LMNA-R482L, формируют более массивные трубки, чем миобласты, несущие LMNA-WT (рис. 2, а и б). Для того чтобы определить, какие регуляторные события могут стоять за выявленными морфологическими различиями, мы проанализировали динамику экспрессии регуляторов и маркеров мышечной дифференцировки: гена *Mymk*, который участвует в регуляции процесса слияния миобластов на ранних этапах мышечной дифференцировки, а также гена эмбрионального миозина *MYH3*. Динамика экспрессии данных генов не различалась между образцами, трансдуцированными конструкциями LMNA-WT и LMNA-R482L (рис. 2, в). Однако уровень экспрессии миогенного транскрипционного фактора *Myf6*, который участвует в регуляции процессов терминальной дифференцировки и запуска экспрессии генов определенных структурных и сократительных белков, характерных для зрелых миофибрилл [3, 24], был существенно ниже в образцах C2C12-LMNA-R482L, чем в образцах C2C12-LMNA-WT (рис. 2, в), что может указывать на замедление процессов созревания мышечного волокна в мутантных культурах. Кроме того, к седьмому дню дифференцировки в клетках C2C12-LMNA-R482L наблюдалось значительное увеличение экспрессии десмина (рис. 2, в) – белка семейства промежуточных филаментов, который экспрессируется в скелетной, сердечной и гладкой мускулатуре, а также в сателлитных клетках мышечной ткани и пролиферирующих миоблестах [25, 26]. Десмин играет важную роль в регуляции слияния миобластов в ходе мышечной дифференцировки и оказывает влияние на миогенные транскрипционные факторы дифференцировки: миогенный регуляторный фактор D (*MyoD*) и миогенин [25].

Стимуляция адипогенеза в образцах миобластов C2C12, модифицированных лентивирусными конструкциями LMNA-WT и LMNA-R482L. Известно, что клетки линии миобластов мышей C2C12 способны при соответствующей стимуляции трансдифференцироваться в клетки, похожие по морфологии на адипоциты, накапливающие жировые капли, которые окрашиваются красителем Oil Red [27, 28]. В нашем исследовании мы проанализировали ответ модифицированных миобластов на стимуляцию жировой

дифференцировки. Результаты анализа этого блока работы представлены на рис. 3. Как и ожидалось, формирование миотрубок в этих условиях было подавлено как в клетках, экспрессирующих ламин дикого типа, так и в клетках, экспрессирующих ламин, несущий мутацию, хотя наблюдалось слияние 2–3 миобластов с образованием малочисленных небольших трубок, демонстрирующих положительную окраску на десмин (рис. 3, а); при этом в обоих типах образцов к седьмому дню после стимуляции сформировались Oil Red-положительные клетки (рис. 3, а), которые были существенно крупнее и многочисленнее в образцах C2C12-LMNA-R482L. Анализ экспрессии маркера дифференцированных адипоцитов и транспортера жирных кислот FABP4 выявил существенный рост FABP4 мРНК в обеих культурах, но в образцах C2C12-LMNA-R482L рост экспрессии FABP4 был существенно выше (рис. 3, б). Кроме того, в образцах C2C12-LMNA-R482L была повышена экспрессия жировой триглицеридной липазы (ATGL) – основной липазы, участвующей в липолизе триглицеридов, заключенных во внутримышечные липидные капли [29, 30]. Помимо этого, образцы C2C12, несущие мутацию, продемонстрировали рост экспрессии перелипина 2 (PLIN2) (рис. 3, б) – белка оболочки внутримышечных липидных капель, одного из преобладающих белков семейства перелипинов, выявленных в скелетных мышцах. Локализация этих белков может указывать на их вовлеченность в контроль липолиза, индуцируемого мышечными сокращениями [30].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клеточная модель, использованная в нашей работе, позволила выявить некоторые закономерности влияния ассоциированной с FPLD2 мутации R482L гена *LMNA* на развитие мышечной ткани и формирование внутримышечных липидных капель.

Полученные нами результаты согласуются с клинической картиной заболевания FPLD2, при котором у пациентов на фоне липодистрофии часто развиваются различные патологии скелетной мускулатуры [15, 17]. У пациентов с FPLD2 в подростковом возрасте происходит потеря подкожной жировой ткани на конечностях и туловище, тогда как на лице, подбородке, шее наблюдается избыточное отложение жира. Также при FPLD2 развиваются метаболические расстройства: нарушение толерантности к глюкозе и сахарный диабет второго типа, гипертриглицеридемия, стеатоз печени (жировой гепа-

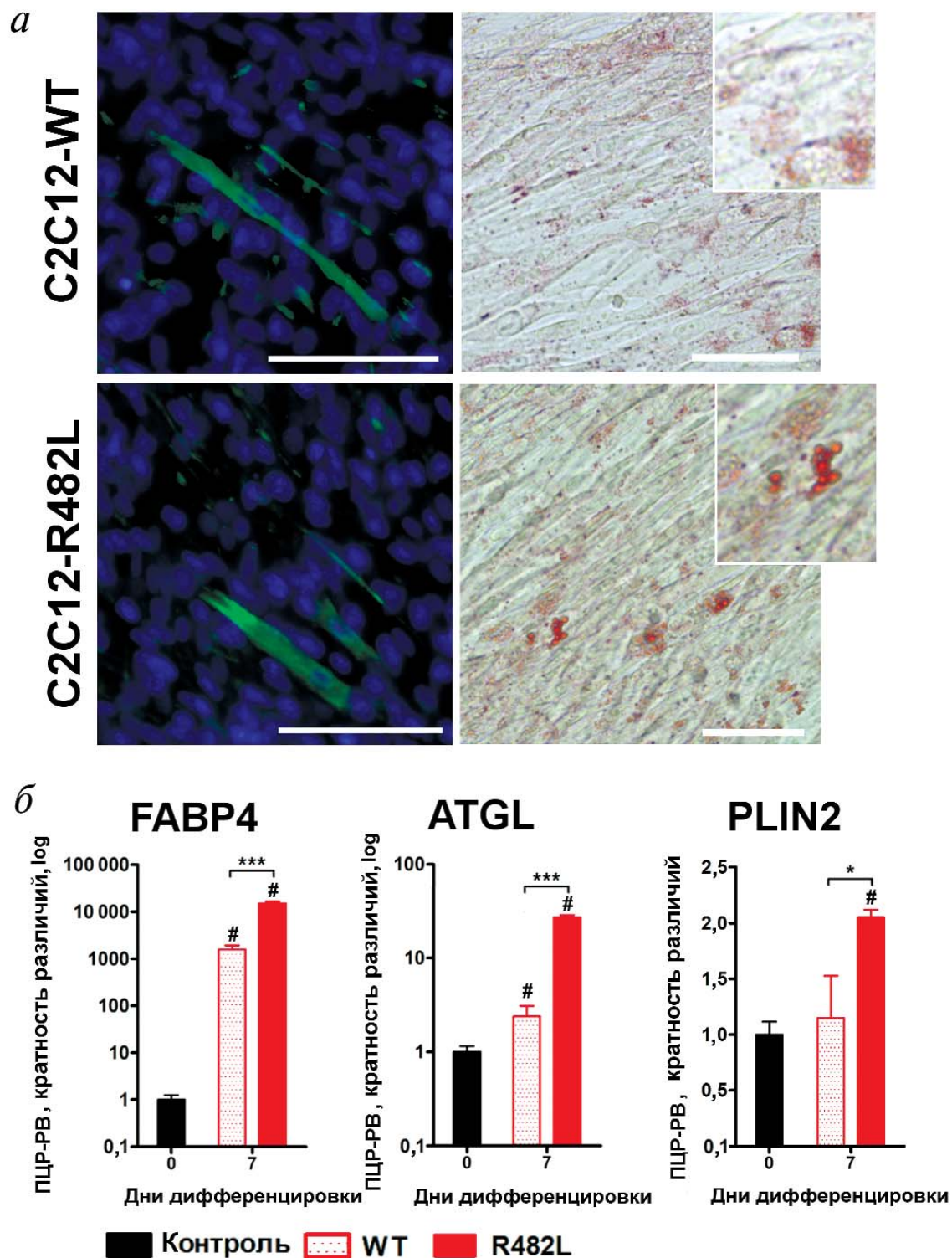


Рис. 3. Стимуляция адипогенеза в образцах миобластов C2C12, модифицированных лентивирусными конструкциями LMNA-WT и LMNA-R482L. *a* – Миотрубки, сформированные в результате жировой дифференцировки генетически модифицированных миобластов C2C12. Миотрубки окрашены антителами к десмину, ядра визуализированы окрашиванием DAPI (синий). Длина масштабной линейки – 50 мкм. Липидные капли окрашены красителем Oil Red, миотрубки визуализированы окраской гематоксилином; *б* – динамика экспрессии маркеров липидных капель: транспортера жирных кислот (FABP4), жировой триглицеридной липазы (ATGL) и перелипина 2 (PLIN). Результаты нормализованы на контрольное значение, рассчитаны и представлены как среднее значение \pm SEM (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$ в сравнении с уровнем экспрессии в контрольном образце)

тит) [18]; нарушения развития и функционирования мышечной ткани могут проявляться как в виде мышечной гипертрофии, так и в виде атрофии и нарушения метаболизма мышечной ткани [20, 31]. Точные механизмы развития перечисленных нарушений остаются невыясненными, однако имеющиеся на настоящий момент клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что FPLD2 не является заболеванием, связанным исключительно с патологией развития жировой ткани [17, 20].

В данной работе мы показали, что индукция мышечной дифференцировки в клетках C2C12, экспрессирующих мутантную форму LMNA-R482L, вызывает формирование гипертрофированных миотрубок, в которых существенно повышена экспрессия десмина. Возможно, формирование массивных миотрубок в LMNA-R482L связано именно с высоким уровнем экспрессии десмина в этих образцах. Известно, что десмин участвует в поддержании объема мышечных волокон и их механических свойств [32, 33], а также вовлечен в контроль перемещения ядер в многоядерном мышечном волокне из центрального положения на периферию волокна. Этот механизм является важным регуляторным событием во время стимуляции миогенеза и обеспечивается в т.ч. жесткой регуляцией структуры ядерной оболочки ламином А/С [34]. Существует блок экспериментальных данных, демонстрирующих связь сигнальных путей, которые в ходе развития мышечной ткани согласованно регулируются десмином и ламином. Так, например, было показано, что в пролиферирующих миобластах, в которых подавлена экспрессия гена *LMNA*, также существенно снижена экспрессия белков, определяющих мышечную дифференцировку, в т.ч. MyoD и десмина, а экзогенная стимуляция экспрессии десмина и/или MyoD в *LMNA*^{-/-}-миобластах сопровождается восстановлением их способности к мышечной дифференцировке. Это позволило авторам предположить, что именно подавление экспрессии MyoD и десмина в *LMNA*^{-/-}-клетках является причиной потери их способности к мышечной дифференцировке, а *LMNA* непосредственно или опосредованно влияет на уровень их экспрессии [35]. Возможно, в нашей экспериментальной модели нарушение взаимодействий ламин- и десмин-зависимых сигнальных путей является одной из причин развития гипертрофированных миотрубок в образцах LMNA-R482L.

Также высказывалась гипотеза, что гипертрофия мышц при FPLD2 может быть обусловлена накоплением липидов в миоцитах, поскольку

резистентность к инсулину связана с уровнем внутриклеточных триглицеридов, а неспособность накапливать подкожный жир может привести к патологическому накоплению жира в мышечной ткани [20]. Однако убедительные клинические данные в поддержку этой гипотезы получены не были. В нашей работе мы обнаружили, что в ответ на стимуляцию жировой дифференцировки миобласты, модифицированные мутантным ламином LMNA-R482L, гораздо активнее накапливают жир, чем клетки, модифицированные ламином дикого типа, а также экспрессируют маркеры внутримышечных липидных капель (рис. 3). Сравнительный анализ результатов, полученных нами ранее [21, 22] и в данном исследовании, убедительно указывает на тканеспецифичность ответа на стимуляцию жировой дифференцировки: в то время как в мезенхимальных стволовых клетках подкожной жировой клетчатки человека и мезенхимальных стволовых клетках миокарда крысы, несущих мутацию LMNA-R482L, существенно снижался потенциал к жировой дифференцировке, в миобластах C2C12, трансдуцированных лентивирусной конструкцией, несущей *LMNA*-R482L, напротив, наблюдалась усиленная стимуляция адипогенеза по сравнению с клетками, несущими *LMNA* дикого типа. Экспериментально продемонстрированный тканеспецифичный ответ хорошо сочетается с разнообразием фенотипов мышечных патологий у пациентов с FPLD2 [15, 17, 20, 31, 36], поскольку в результате накопления внутримышечных жировых отложений может наблюдаться как увеличение объема мышечных волокон, так и атрофия мышечной ткани вследствие нарушения взаимодействий мышца-жир и метаболических расстройств, связанных с патологическим увеличением внутримышечных липидных отложений.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-15-10178).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hutchison, C.J., and Worman, H.J. (2004) A-type lamins: guardians of the soma? *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1062–1067, doi: 10.1038/ncb1104-1062.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993) Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C, *J. Biol. Chem.*, **268**, 16321–16326.
- Dubinska-Magiera, M., Zaremba-Czogalla, M., and 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, doi: 10.1007/s00018-012-1190-3.
- Schreiber, K.H., and Kennedy, B.K. (2013) When lamins go bad: nuclear structure and disease, *Cell*, **152**, 1365–1375, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.015.
- Ostlund, C., Bonne, G., Schwartz, K., and Worman, H.J. (2001) Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy, *J. Cell Sci.*, **114**, 4435–4445.
- De Las Heras, J.I., Meinke, P., Batrakou, D.G., Srsen, V., Zuleger, N., Kerr, A.R., and Schirmer, E.C. (2013) Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity, *Nucleus*, **4**, 460–477, doi: 10.4161/nucl.26872.
- Manju, K., Muralikrishna, B., and Parnaik, V.K. (2006) Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci, *J. Cell Sci.*, **119**, 2704–2714.
- Parnaik, V.K., and Manju, K. (2006) Laminopathies: multiple disorders arising from defects in nuclear architecture, *J. Biosci.*, **31**, 405–421.
- Sebillon, P., Bouchier, C., Bidot, L.D., Bonne, G., Ahamed, K., Charron, P., Drouin-Garraud, V., Millaire, A., Desrumaux, G., Benaiche, A., Charniot, J.-C., Schwartz, K., Villard, E., and Komajda, M. (2003) Expanding the phenotype of LMNA mutations in dilated cardiomyopathy and functional consequences of these mutations, *J. Med. Genet.*, **40**, 560–567.
- Sehgal, P., Chaturvedi, P., Kumaran, R.I., Kumar, S., and Parnaik, V.K. (2013) Lamin A/C haploinsufficiency modulates the differentiation potential of mouse embryonic stem cells, *PLoS One*, **8**, e57891, doi: 10.1371/journal.pone.0057891.
- Naetar, N., Ferraioli, S., and Foisner, R. (2017) Lamins in the nuclear interior – life outside the lamina, *J. Cell Sci.*, **130**, 2087–2096, doi: 10.1242/jcs.203430.
- Speckman, R.A., Garg, A., Du, F., Bennett, L., Veile, R., Arioglu, E., Taylor, S.I., Lovett, M., and Bowcock, A.M. (2000) Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C, *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 1192–1198, doi: 10.1086/302836.
- Hegele, R.A., Huff, M.W., and Young, T.K. (2001) Common genomic variation in LMNA modulates indexes of obesity in Inuit, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 2747–2751, doi: 10.1210/jcem.86.6.7550.
- Garg, A., Peshock, R.M., and Fleckenstein, J.L. (1999) Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 70–74, doi: 10.1210/jcem.84.1.5383.
- Ji, H., Weatherall, P., Adams-Huet, B., and Garg, A. (2013) Increased skeletal muscle volume in women with familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **98**, E1410–E1413, doi: 10.1210/jc.2013-1297.
- Shackleton, S., Lloyd, D.J., Jackson, S.N.J., Evans, R., Niermeijer, M.F., Singh, B.M., Schmidt, H., Brabant, G., Kumar, S., Durrington, P.N., Gregory, S., O’Rahilly, S., and Trembath, R.C. (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy, *Nat. Genet.*, **24**, 153–156, doi: 10.1038/72807.
- Vantyghem, M.C., Pigny, P., Maurage, C.A., Rouaix-Emery, N., Stojkovic, T., Cuisset, J.M., Millaire, A., Lascols, O., Vermersch, P., Wemeau, J.L., Capeau, J., and Vigouroux, J.L. (2004) Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 5337–5346, doi: 10.1210/jc.2003-031658.
- Guenant, A.C., Briand, N., Bidault, G., Afonso, P., Bereziat, V., Vazier, C., Lascols O., Caron-Debarle, M., Capeau, J., and Vigouroux, C. (2014) Nuclear envelope-related lipodystrophies, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **29**, 148–157, doi: 10.1016/j.semcdb.2013.12.015.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooij, A.J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., de Visser, M., and Schwartz, K. (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B), *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1453–1459.
- Boschmann, M., Engeli, S., Moro, C., Luedtke, A., Adams, F., Gorzelniak, K., Rahn, G., Mahler, A., Dobberstein, K., Kruger, A., Schmidt, S., Spuler, S., Luft, F.C., Smith, S.R., Schmidt, H.H.-J., and Jordan, J. (2010) LMNA mutations, skeletal muscle lipid metabolism, and insulin resistance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, 1634–1643, doi: 10.1210/jc.2009-1293.
- Malashicheva, A., Bogdanova, M., Zabirnyk, A., Smolina, N., Ignatieva, E., Freilikhman, O., Fedorov, A., Dmitrieva, R., Sjoberg, G., Sejersen, T., and Kostareva, A. (2015) Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner, *Mol. Genet. Metab.*, **115**, 118–127, doi: 10.1016/j.ymgme.2015.04.006.
- Perpelina, K., Dmitrieva, R., Ignatieva, E., Borodkina, A., Kostareva, A., and Malashicheva, A. (2018) Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling, *Biochem. Cell Biol.*, **96**, 342–348, doi: 10.1139/bcb-2017-0210.
- Perpelina, K.I., Smolina, N.A., Zabirnyk, A.S., Dmitrieva, R.I., Malashicheva, A.B., and Kostareva, A.A. (2017) The role of LMNA mutations in myogenic differentiation of C2C12 and primary satellite cells, *Cell Tissue Biol.*, **59**, 117–124, doi: 10.1134/S1990519X17030087.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a008342, doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
- Hol, E.M., and Capetanaki, Y. (2017) Type III intermediate filaments desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, and peripherin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9**, a021642, doi: 10.1101/cshperspect.a021642.
- Capetanaki, Y., Milner, D.J., and Weitzer, G. (1997) Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences, *Cell Struct. Funct.*, **22**, 103–116.
- Holst, D., Luquet, S., Kristiansen, K., and Grimaldi, P.A. (2003) Roles of peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma in myoblast transdifferentiation, *Exp. Cell Res.*, **288**, 168–176, doi: 10.1016/S0014-4827(03)00179-4.
- Grimaldi, P.A., Teboul, L., Inadera, H., Gaillard, D., and Amri, E.Z. (1997) Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones, *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, **57**, 71–75.

29. Bosma, M. (2016) Lipid droplet dynamics in skeletal muscle, *Exp. Cell Res.*, **340**, 180–186, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.023.
30. MacPherson, R.E.K., Ramos, S.V., Vandenboom, R., Roy, B.D., and Peters, S.J. (2013) Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **304**, R644–R650, doi: 10.1152/ajpregu.00418.2012.
31. Rankin, J., and Ellard, S. (2006) The laminopathies: a clinical review, *Clin. Genet.*, **70**, 261–274, doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00677.x.
32. Shah, S.B., Davis, J., Weisleder, N., Kostavassili, I., McCulloch, A.D., Ralston, E., Capetanaki, Y., and Lieber, R.L. (2004) Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation, *Biophys. J.*, **86**, 2993–3008, doi: 10.1016/S0006-3495(04)74349-0.
33. Ralston, E., Lu, Z., Biscocho, N., Soumaka, E., Mavroidis, M., Prats, C., Lomo, T., Capetanaki, Y., and Ploug, T. (2006) Blood vessels and desmin control the positioning of nuclei in skeletal muscle fibers, *J. Cell. Physiol.*, **209**, 874–882, doi: 10.1002/jcp.20780.
34. Roman, W., Martins, J.P., Carvalho, F.A., Voituriez, R., Abella, J.V.G., Santos, N.C., Cadot, B., Way, M., and Gomes, E.R. (2017) Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle, *Nat. Cell Biol.*, **19**, 1189–1201, doi: 10.1038/ncb3605.
35. Frock, R.L., Kudlow, B.A., Evans, A.M., Jameson, S.A., Hauschka, S.D., and Kennedy, B.K. (2006) Lamin A / C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation, *Genes Dev.*, **20**, 486–500, doi: 10.1101/gad.1364906.
36. Соркина Е.Л., Калашникова М.Ф., Мельниченко Г.А., Тюльпаков А.Н. (2015) Семейная парциальная липодистрофия (синдром DUNNIGAN) вследствие мутации в гене *LMNA*: первое описание клинического случая в России, *Терапевтический архив*, **87**, 83–87, doi: 10.17116/terarkh201587383-87.

LMNA GENE R482L MUTATION AFFECTS THE DYNAMICS OF C2C12 MYOGENIC DIFFERENTIATION AND STIMULATES THE FORMATION OF INTRAMUSCULAR LIPID DROPLETS

**N. V. Khromova^{1*}, K. I. Perepelina^{1,2}, O. A. Ivanova^{1,3},
A. B. Malashicheva^{1,2}, A. A. Kostareva¹, and R. I. Dmitrieva¹**

¹ *Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, 197341 St. Petersburg, Russia; E-mail: khromova@almazovcentre.ru, akostareva@hotmail.com, renata.i.dmitrieva@gmail.com*

² *St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: kseniya.perepelina@mail.ru, amalashicheva@gmail.com*

³ *St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 197101 St. Petersburg, Russia; E-mail: astroksana@gmail.com*

Received September 12, 2018

Revised November 16, 2018

Accepted November 16, 2018

Missense mutations in the *LMNA* gene that result in the replacement of a highly conserved arginine 482 in the C-terminal globular domain of lamin A/C are associated with Dunnigan familial partial lipodystrophy (FPLD2). Various disorders of muscle development are often detected in FPLD2 patients, and molecular mechanisms of those disorders are not fully understood. The aim of our work was to investigate the effects of the *LMNA* gene R482L mutation on the dynamics of muscle differentiation and the intramuscular fat accumulation during muscle development. The experimental cell model based on C2C12 mouse myoblasts was employed. C2C12 cells were modified with lentiviral constructs bearing wild type human *LMNA* gene (*LMNA*-WT) or *LMNA* gene R482L mutation. In myoblasts carrying *LMNA*-WT or *LMNA* gene R482L mutation, myogenesis and adipogenesis were stimulated, and then the dynamics of expression of muscular and adipose differentiation markers, the morphology of differentiated myotubes, and the dynamics of formation of intramuscular fat drops were analyzed. We demonstrated that in C2C12-*LMNA*-R482L samples, desmin expression was upregulated at all stages of muscle differentiation, and myoblasts bearing the mutation differentiated into hypertrophic (compared to C2C12-*LMNA*-WT) myotubes. The downregulated expression level of myogenic transcription factor Myf6 in *LMNA*-R482L samples indicated a delay in maturation of muscle fibers. In response to stimulation of fat differentiation, *LMNA*-R482L myoblasts accumulated fat much more actively than *LMNA*-WT myoblasts and demonstrated increased expression levels of lipid droplets markers FABP4, ATGL, PLIN2. To summarize, we revealed that the *LMNA* gene R482L mutation affects the dynamics of myogenesis in C2C12 myoblasts and stimulates the formation of fat deposits in myoblasts and myotubes in tissue-specific manner.

Keywords: *LMNA* gene, *LMNA* gene R482L mutation, Dunnigan familial partial lipodystrophy, myogenesis, adipogenesis, C2C12 myoblasts