

*На правах рукописи*

Игнатъева Елена Владимировна

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА ЛАМИНА А G232E И R482L  
НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК СКЕЛЕТНОЙ  
МУСКУЛАТУРЫ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

1.5.22 – клеточная биология

Санкт-Петербург

2023 год

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

**Научный руководитель:** Дмитриева Рената Игоревна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы клеточной биологии Института молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

**Официальные оппоненты:**

**Попов Даниил Викторович** – доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник – заведующий лабораторией физиологии мышечной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук»

**Пчелина Софья Николаевна** – доктор биологических наук, заведующая лабораторией медицинской генетики, руководитель отдела молекулярно-биологических и нанобиологических технологий Научно-исследовательского центра Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д.69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д.12 и на сайте <https://iemspb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор биологических наук

Алешина Галина Матвеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования.

Ламины – белки промежуточных филаментов, главный компонент ядерной ламины – фибриллярной ячеистой структуры, расположенной на нуклеоплазматической стороне внутренней ядерной мембраны и играющей роль каркаса клеточного ядра. Помимо выполнения структурной роли, ламина, находясь под внутренней ядерной мембраной, непосредственно взаимодействует с хроматином, предоставляет сайты для закрепления хроматиновых доменов высшего порядка и таким образом оказывается прямо вовлечена в регуляцию экспрессии генов и процессы, связанные с ремоделированием хроматина: репликацию, транскрипцию, контроль клеточного цикла.

Вследствие многообразия и важности функций ламинов нарушение корректности их функционирования в результате генетических мутаций приводит к широкому спектру заболеваний, называемых ламинопатиями. К настоящему времени описано более 450 мутаций в гене *LMNA*, кодирующем ламины А-типа, и около 15 ассоциированных с ними клинических расстройств. На сегодняшний день это наибольшее количество мутаций, описанных для одного гена, и наибольшее количество заболеваний, обусловленных мутациями в одном гене.

Таким образом, наряду с генетической вариабельностью для этих заболеваний характерно чрезвычайное клиническое многообразие. Ламины А-типа экспрессируются практически во всех дифференцированных соматических клетках, при этом их мутации (способом, которому пока не найдено объяснений) ведут к формированию разных заболеваний, в том числе тканеспецифичных. Подавляющее большинство мутаций гена *LMNA* связано с заболеваниями поперечно-полосатой мускулатуры. Превалирующим типом являются миссенс-мутации, или точечные мутации, приводящие к аминокислотным заменам. При этом между клинической картиной и/или видом и локализацией мутации отсутствует четкая корреляция.

Если исходить из роли ядерной ламины в организации и регуляции генома, исследование механизмов функционирования разных мутантных форм ламинов является частью решения масштабной биологической проблемы – получения комплексного представления о регуляции экспрессии генов в разных типах клеток. Подробное изучение этого актуального научного вопроса позволит приблизиться и к решению сложных практических задач. Поскольку механизмы, с помощью которых мутации *LMNA* приводят к мышечно-специфическим и другим тканеспецифичным дефектам, остаются неясными, это препятствует разработке эффективных терапевтических подходов. До сих пор не предложено соответствующего лечения для ламинопатий, поражающих скелетную мускулатуру. Эти заболевания широко варьируют по тяжести и, как правило, имеют неблагоприятный прогноз. Сегодня их лечение ограничено лишь облегчением симптомов, что определяет актуальность исследования молекулярного патогенеза ламинопатий.

Таким образом, выявление молекулярных дефектов, вызванных действием разных мутантных форм ламинов, и детальное изучение их влияния на свойства мышечных клеток позволит расширить представление о координации регуляции экспрессии генов и структурно-функциональной организации клетки. Комплексное знание картины молекулярных процессов, приводящих к развитию скелетно-мышечных ламинопатий, в свою очередь, будет являться основой для разработки методов диагностики и терапии этих заболеваний.

#### **Степень разработанности темы исследования.**

Механизмы действия мутаций практически не изучены. Несмотря на то, что около 80% всех мутаций *LMNA* специфическим образом затрагивают поперечно-полосатую мышечную ткань, молекулярная основа такого тканеспецифичного проявления остается непонятной. Результаты исследований, проведенных на моделях дефицитных по ламину А мышей, демонстрируют, что ламина играет неоспоримо важную роль в дифференцировке мышечных клеток (Frock et al., 2006), (Gnocchi et al., 2011), (Cohen et al., 2013). С этим согласуются наблюдения аномалий (а именно ингибирования) дифференцировки в миобластах, несущих разные мутации ламина А, *in vitro* (Favreau et al., 2004), (Håkelién et al., 2008), (Markiewicz et al., 2005). Однако еще далеко до ясного понимания механизмов и специфичности влияния мутаций на процесс миогенной дифференцировки и функционирования мышечных клеток в целом.

Особенно важен (и крайне слабо изучен) вопрос о влиянии мутаций ламина А/С на метаболизм клеток скелетной мускулатуры. Скелетные мышцы – критически важный метаболический орган, ответственный за энергетический баланс всего организма. В связи с этим метаболизм является ключевой системой, которой наносится ущерб при заболеваниях скелетной мускулатуры. На сегодняшний день становится очевидным факт, что, независимо от первоначальной причины, митохондриальная дисфункция является общей чертой генетически обусловленных заболеваний скелетной мускулатуры (Ignatieva et al., 2021). Единичные работы предоставили доказательства участия ламина А в регуляции энергетических и метаболических путей, и все они в качестве модельного объекта использовали неммышечные клетки – фибробласты (Songbi Chen et al., 2009), (Caron et al., 2007), (Sieprath et al., 2015) либо клетки HeLa (Magagnotti et al., 2012). Несмотря на «приверженность» проявления мутаций ламина А/С именно к поперечно-полосатой мускулатуре, на сегодняшний день только одно исследование было посвящено изучению метаболизма скелетной мускулатуры при ламинопатиях (Boschmann et al., 2010). Оно выявило нарушения в окислении жирных кислот и глюкозы, а также изменения в экспрессии генов гликолиза и комплекса I дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, поскольку нарушения энергетического баланса в мышечной ткани основываются на абберациях клеточной биоэнергетики, представляется чрезвычайно важным изучение ассоциированных с патологией конкретных метаболических изменений в миотрубках с мутантным ламинном А.

В настоящей работе для исследования влияния мутаций ламина А на свойства мышечных клеток были выбраны две мутации, которые затрагивают разные функциональные отделы белковой молекулы и ассоциированы с разными клиническими фенотипами – G232E, описанная у пациентов с мышечной дистрофией, и R482L, ответственная за проявление семейной частичной липодистрофии, также сочетающейся со скелетно-мышечными нарушениями. Они различаются, по нашим данным, в своих проявлениях на клеточном и молекулярном уровне (Богданова и др., 2014), (Malashicheva et al., 2015) и, по имеющимся сведениям, в механизмах действия (Chaturvedi & Parnaik, 2010), (Manju et al., 2006). Очевидно, что за влиянием этих мутаций стоят разные патомеханизмы, что приводит к разным клиническим проявлениям их в скелетной мускулатуре.

**Цели и задачи исследования.** Цель диссертационной работы – исследование влияния мутаций ламина А G232E и R482L, ассоциированных со скелетно-мышечными ламинопатиями, на рост, дифференцировку и метаболизм клеток скелетной мускулатуры.

Были поставлены следующие задачи:

1. Получить и охарактеризовать экспериментальную клеточную модель на основе линии миобластов мышцы C2C12 со стабильной экспрессией ламина А человека дикого типа и с мутациями G232E/R482L.
2. Оценить влияние экспрессии ламина А, несущего мутации G232E и R482L, на морфологию ядер и пролиферативные характеристики миобластов.
3. Изучить воздействие мутаций G232E и R482L ламина А на формирование дифференцированных мышечных клеток и их морфологию.
4. Исследовать влияние мутаций G232E и R482L ламина А на клеточный метаболизм и митохондриальную биоэнергетику дифференцированных мышечных клеток.
5. Оценить влияние мутаций на экспрессионную программу контроля клеточной пролиферации, миогенеза, метаболической регуляции системы окислительного фосфорилирования и гликолиза.

**Научная новизна работы.**

В представленной работе впервые на клеточной модели ламинопатий, ассоциированных со скелетно-мышечными нарушениями, проведено комплексное исследование одновременно транскриптома и функциональных свойств мышечных клеток. Впервые исследовано влияние мутаций G232E и R482L на экспрессионный профиль молекулярных путей, задействованных в регуляции мышечной дифференцировки и клеточного метаболизма, а также функциональные характеристики миобластов и миотрубок, несущих ламина с данными мутациями. Получены новые данные об аномалиях в синхронизации и контроле клеточного цикла и дифференцировки в линиях, экспрессирующих мутантные ламины. Впервые свидетельство разрегулированного контроля процесса дифференцировки миобластов вследствие мутаций в гене *LMNA* получено с применением технологии РНК-

секвенирования, что позволило осуществить детальный анализ профилей экспрессии задействованных контрольных клеточных путей.

Новизна представленного исследования заключается также в получении данных о метаболическом потенциале дифференцированных миотрубок, несущих мутантные ламины. В работе впервые представлены результаты, демонстрирующие различающееся влияние мутаций ламина А на метаболизм и биоэнергетику мышечных клеток, что свидетельствует о различных механизмах действия мутаций при ламин-ассоциированных патологиях. Впервые показано различающееся соотношение двух основных энергообразующих путей (митохондриального дыхания и гликолиза) у *LMNA*-мутантных миогенных линий.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Результат работы – комплексный анализ изменений экспрессии набора генов, вовлеченных в мышечную дифференцировку и энергетический метаболизм в миообластах и дифференцированных миотрубках с мутантными ламинами, подкрепленный данными функциональных экспериментов, что в совокупности имеет фундаментальное значение для понимания патофизиологических механизмов проявления мутаций ламина А.

Важная часть работы – идентификация изменений биоэнергетики дифференцированных миотрубок в присутствии мутаций ламина А. Полученные данные подтверждают перспективность исследования метаболического статуса мышечных типов клеток при поражениях скелетной мускулатуры. Обнаруженные в работе изменения метаболического фенотипа миотрубок, будучи, без сомнения, вовлечены в патогенез и развитие скелетно-мышечных патологий, служат привлекательной мишенью при создании подходов к их терапии.

Данные работы отражают успешные эксперименты по использованию разработанной клеточной модели для изучения механизмов влияния мутаций ламина А на функционирование мышечных клеток. Полученная и охарактеризованная экспериментальная модель позволит в дальнейшем исследовать как общие закономерности, так и индивидуальные для каждой мутации особенности проявления при развитии и прогрессе патологии.

#### **Методология и методы исследования.**

Для исследования влияния мутаций ламина А на свойства мышечных клеток была получена экспериментальная клеточная модель на основе линии миообластов мышцы C2C12. Для этого был проведен направленный сайт-специфический мутагенез экспрессионного вектора, несущего кДНК гена ламина А человека. Путем лентивирусной трансдукции и селекции клеток по устойчивости к антибиотику получили постоянные клеточные линии, экспрессирующие ламин А с мутациями, ассоциированными со скелетно-мышечными патологиями. Эффекты влияния мутаций с применением полученной трансгенной модели исследовали, используя комплекс цитологических (анализ морфологических характеристик и скорости клеточной пролиферации, иммуноцитохимическое окрашивание), молекулярно-биологических (анализ экспрессии мРНК с применением ПЦР в режиме реального времени,

иммуноблоттинг) и функциональных цитофизиологических (анализ клеточного метаболизма) методов, в сочетании с секвенированием транскриптома.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Проявление мутаций ламина А G232E и R482L связано с нарушениями контроля генной экспрессионной программы, что вызывает изменение клеточного фенотипа в патологическом направлении. Сдвиги в экспрессионной программе могут быть как общими, так и специфичными для конкретной мутации, что, в свою очередь, приводит к специфическим патологическим фенотипам.
2. Мутации ламина А G232E и R482L вызывают изменение морфологии ядер и пролиферативной активности миобластов C2C12, что сопровождается спонтанной активацией про-миогенной программы и нарушает согласованную регуляцию механизмов контроля динамики клеточного цикла и дифференцировки на ранних этапах миогенеза.
3. Изменение функциональных свойств миобластов приводит к изменениям морфологических и функциональных характеристик клеток при их дифференцировке в миотрубки.
4. Мутации изменяют метаболический/биоэнергетический фенотип дифференцированных мышечных клеток, приводя в результате к митохондриальной дисфункции и снижению гликолитической активности. Изменения могут быть как общими, так и специфичными для конкретной мутации и согласуются с изменениями в экспрессии генов соответствующих метаболических путей.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования.**

По результатам диссертационного исследования опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science. Положения работы представлены в качестве устных и стендовых докладов на российских конференциях Всероссийская XX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Ленинградская область, 2019), IV и V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019, 2022). Достоверность результатов обосновывается использованием современных высокотехнологичных методов исследования, а также применением статистических методов анализа полученных данных. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, результаты вошли в отчет по гранту 16-15-10178.

#### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 261 наименование, и приложения. Материалы диссертации изложены на 120 страницах машинописного текста и иллюстрированы 7 таблицами и 45 рисунками.

### **Личный вклад автора.**

Экспериментальная клеточная модель получена непосредственно автором; большая часть экспериментальных процедур также проведена автором лично. Данные по исследованию морфологических характеристик клеточных моделей и результаты ПЦР-анализа получены совместно с сотрудниками Института молекулярной биологии и генетики (ИМБГ) ФГБУ «НМИЦ им. В.А.Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Комаровой М.Ю. и Хромовой Н.В. Биоинформатический анализ выполнен сотрудником ИМБГ Ивановой О.А. Полученные и представленные в работе данные были обработаны, проанализированы и интерпретированы автором совместно с научным руководителем.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

**Получение клеточной модели.** Для изучения влияния мутаций ламина А на свойства мышечных клеток получили и использовали экспериментальную клеточную модель на основе линии миобластов мыши C2C12. Для модификации генома миобластов применили трансдукцию лентивирусными векторами, несущими ламин А человека дикого типа (WT) и ламин А с мутациями G232E и R482L. Лентивирусный экспрессионный вектор со вставкой кДНК гена *LMNA* человека pCDHblast MCSNard OST-LMNA (плазмида #22661) получен от Addgene (США). Для генерации конструкций с мутациями *LMNA* использовали стратегию направленного сайт-специфического мутагенеза целой плазмиды. Лентивирусы производили путем временной котрансфекции клеток HEK293T экспрессионным вектором и вспомогательными плазмидами по протоколу, разработанному Д.Троно (<http://tcf.epfl.ch>). Трансдуцированные клетки отбирались селекцией по устойчивости к антибиотику бластицидину (10 мкг/мл). Популяции, устойчивые к антибиотикам, были размножены и впоследствии использованы непосредственно для экспериментального анализа. Таким образом, в экспериментах использовались три постоянные клеточные линии: WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA.

**Анализ клеточной пролиферации.** Культивируемые миобласты мыши C2C12 линий WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA снимали раствором трипсина/ЭДТА и подсчитывали в суспензии в счетной камере каждые 24 часа в течение 3 дней. Для сравнения скорости пролиферации клеточных линий при расчете времени удвоения популяции (PDT, population doubling time) использовалась формула  $PDT=t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ , где  $t$  – время культивирования,  $N_0$  – начальное количество клеток,  $N_t$  – количество клеток после культивирования.

**Анализ морфологических характеристик дифференцированных миотрубок.** Миотрубки визуализировали с помощью специфического красителя для митохондрий MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific, США); ядра окрашивали DAPI



(diamidino-2-phenylindole, Thermo Fisher Scientific, США). Размер миотрубок определяли, измеряя их ширину в поперечном сечении и длину в продольном сечении. Коэффициент слияния рассчитывался как отношение числа ядер в миотрубках с тремя или более ядрами к общему числу ядер.

**Иммуноцитохимическое окрашивание и иммуноблоттинг.** Трансгенный ламин А человека выявляли в клетках с использованием первичных антител NCL-LAM-A/C (anti-human, Leica Biosystems). Микроскопический анализ проводили на приборе Axio Observer (Zeiss, Германия). Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Изображение визуализировали при помощи геледокументирующей системы Fusion Fx (Vilber Lourmat, Франция).

**ПЦР в режиме реального времени.** Тотальную РНК из клеток выделяли с использованием реагента для экстракции РНК ExtractRNA (Евроген, Россия). кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT kit с обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали реакционную смесь qPCR mix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия) и праймеры, сконструированные с помощью инструмента Primer-BLAST. Уровень экспрессии гена *LMNA* человека в генетически модифицированных миобластах мыши C2C12 анализировали с применением технологии TaqMan® Gene Expression Assay, зонд Hs00153462 Lmna FAM (Applied Biosystems, Великобритания).

**Митохондриальный и гликолизный стресс-тесты.** Параметры клеточного дыхания и гликолиза измеряли с помощью анализатора клеточного метаболизма XFe24 (Agilent Technologies, США) по протоколам, предоставленным производителем. Данные были нормализованы по содержанию белка.

**Конструирование библиотек и секвенирование РНК.** Библиотеки сконструированы с использованием набора Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, США), с сохранением информации о направлении цепей. Для каждого образца для РНК-секвенирования использовали три независимых биологических репликата. Библиотеки были мультиплексированы, кластеризованы и секвенированы на анализаторе Illumina HiSeq 2500 (набор реагентов TruSeq v3), как рекомендовано производителем, в режиме одноконцевого чтения 50 пар нуклеотидов и считыванием баркода из восьми оснований

**Обработка данных РНК-секвенирования.** Исходные данные были получены в формате FASTQ, качество данных оценивалось в программе FastQC (v0.11.5) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Фильтрация ридов и удаление адаптеров выполнены с помощью программы fastp (v0.20.0) (Shifu Chen et al., 2018). Прочтения выровнены на геном мыши с использованием маппера STAR v2.604a (Dobin et al., 2013) с референсным геномом GRCm38.p6 и аннотацией GENECODE M22. Подсчет ридов производился с помощью программы featureCounts v.1.6.4 (Liao et al., 2014). ДЭГ определяли с использованием пакета для R DESeq2 (Love et al., 2014) с попарным сравнением условий, значения p-value скорректированы с использованием процедуры Бенджамини-Хохберга и отфильтрованы с применением критерия FDR (false discovery rate) = 0,01. Молекулярные пути из баз данных Gene

Ontology, Hallmark, и KEGG анализировали с помощью пакетов fgsea R (Korotkevich et al., 2016) и msigdb (Liberzon et al., 2015), FDR = 0,05. Данные секвенирования и таблица экспрессии доступны в Gene Expression Omnibus (GEO) под номером GSE150365.

**Статистическая обработка данных.** Статистический анализ проводился с использованием пакета GraphPad Prism версии 8.4.1 для Windows (GraphPad Software, США).

## Результаты и обсуждение

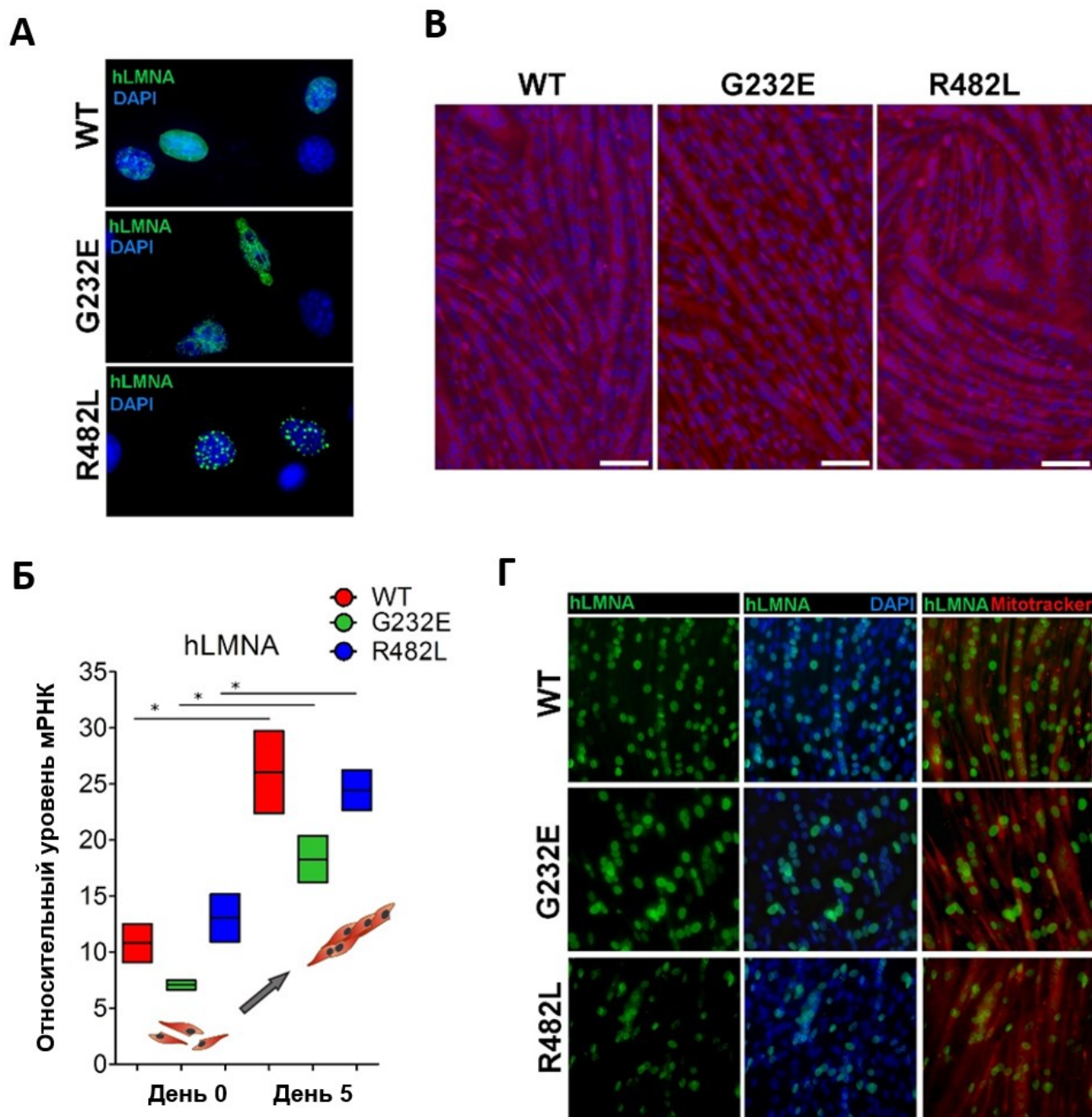
### 1. Валидация экспериментальной клеточной модели

**1.1 Верификация экспрессии трансгенов.** Эффективность экспрессии лентивирусных трансгенов и корректность внутриклеточной локализации трансгенного белка в модифицированных клетках C2C12 анализировали методами ПЦР в реальном времени и иммуоцитохимического окрашивания антителами, специфичными к ламину А человека, которые не проявляют кросс-реактивности с ламинном А мыши (рис. 1). Все три полученные генетически модифицированные линии экспрессируют ламин А человека на уровне мРНК (рис. 1Б) и белка, локализованного в клеточных ядрах (рис. 1А).

**1.2 Исследование влияния экспрессии мутантных ламинов на морфологию ядер.** В присутствии мутаций ламина А G232E/R482L в клетках C2C12 были обнаружены изменения морфологии клеточных ядер. Мутантные ламины образуют внутриядерные агрегаты, что вызывает пузырение ядерной мембраны (рис. 1А), аналогично ранее опубликованным данным (К. Perepelina et al., 2018), (Khromova et al., 2019). Структурные аномалии ядерной ламины, вызванные мутациями *LMNA*, могут способствовать изменению взаимодействия ламинов с хроматином и вызывать серьезные изменения на молекулярном уровне.

**1.3 Миогенная дифференцировка трансгенных линий.** Все три линии, трансдуцированные лентивирусным ламинном А, успешно дифференцировались с формированием зрелых мультиядерных миотрубок (рис. 1В). При этом уровень экспрессии мРНК *LMNA* человека значительно увеличивался в дифференцированных миотрубках по сравнению с недифференцированными миобластами, как и ожидалось (рис. 1Б) (Constantinescu et al., 2006). Кроме того, ламин А человека детектировался антителами в миоцарах дифференцированных миотрубок всех трех трансгенных линий (рис. 1Г).

Таким образом, полученная модель удовлетворяет экспериментальным требованиям для использования ее в исследовании особенностей роста, дифференцировки и метаболизма клеток скелетной мускулатуры в присутствии мутантного ламина А.



**Рисунок 1. Валидация экспериментальной клеточной модели:** (А) Верификация экспрессии трансгенного ламина А человека в миобластах мыши C2C12. Клетки были окрашены антителами к ламину А, распознающими только ламин А человека и не проявляющими кросс-реактивности с ламин А мыши. Ядра с мутантными формами ламина А G232E/R482L-LMNA демонстрируют агрегаты и пузырение мембраны в некоторых трансдуцированных клетках в результате присутствия мутаций; (Б) Оценка экспрессии мРНК LMNA человека (hLMNA) в трансгенных миобластах и дифференцированных миотрубках C2C12 методом ПЦР в реальном времени (n=3); (В) Стимуляция миогенной дифференцировки приводит к успешному образованию миотрубок во всех трансгенных линиях (размер масштабной линейки 200 мкм); (Г) Ядра в миотрубках демонстрируют положительное окрашивание на ламин А человека (зеленый). Ядра визуализированы окраской DAPI (синий), миотрубки – с помощью красителя (Mitotracker), специфичного для митохондрий (красный).

## 2. Влияние мутаций на функциональные свойства миобластов C2C12

### 2.1 Влияние мутаций на пролиферативную активность миобластов C2C12.

Анализ пролиферативной активности трансгенных миобластов C2C12 показал существенную разницу между линией дикого типа и мутантными линиями. Через 24 часа после посева клетки, экспрессирующие ламин А с мутациями G232E и R482L, продемонстрировали сниженную скорость пролиферации по сравнению с WT-LMNA. При этом наименьший пролиферативный потенциал и наибольшее время удвоения клеточной популяции наблюдалось у миобластов линии G232E-LMNA (рис. 2А).

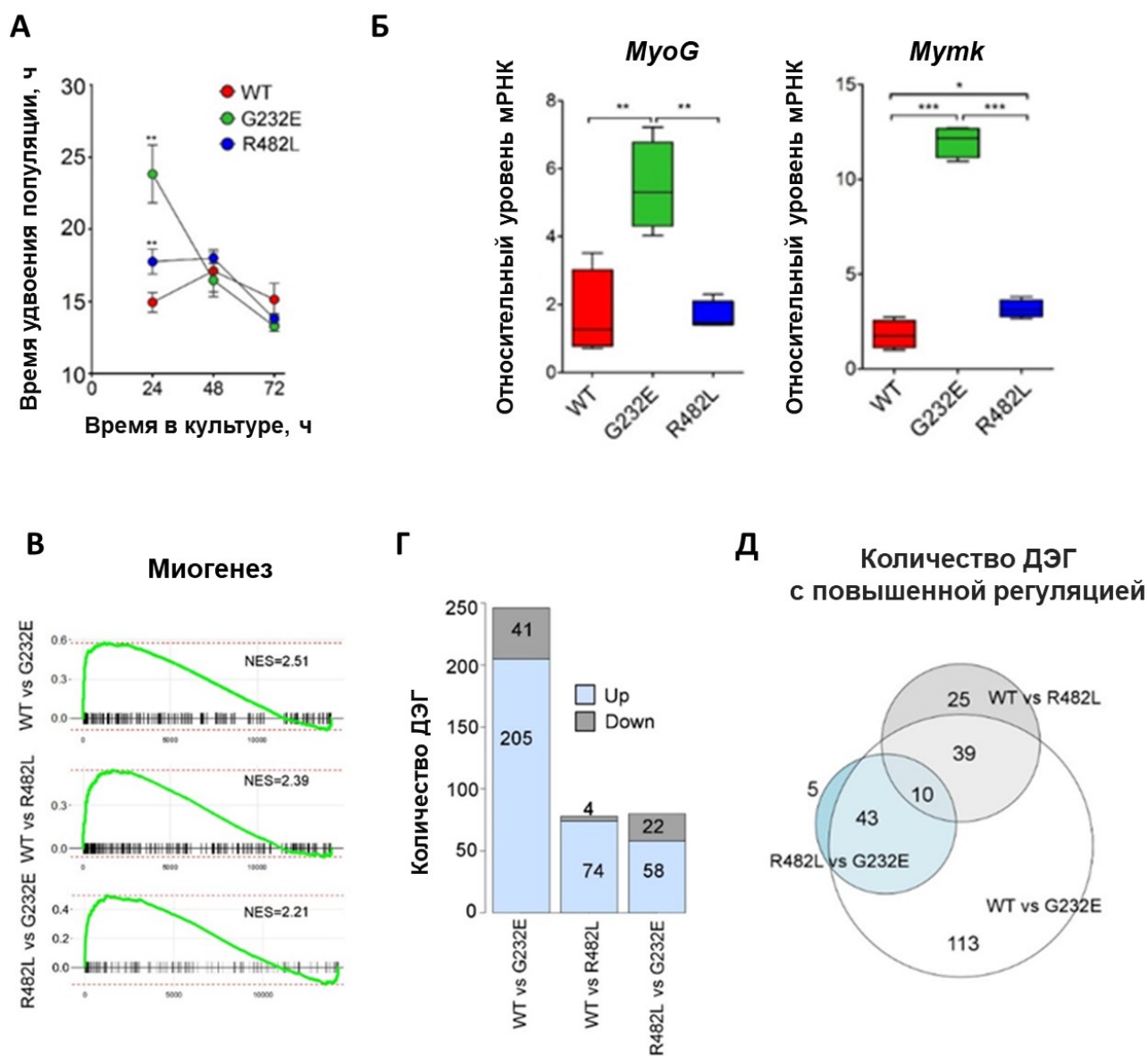
**2.2 Анализ экспрессии ключевых генов, регулирующих ранние стадии миогенеза.** Существенное снижение пролиферативной активности миобластов G232E/R482L-LMNA может быть связано со спонтанным переходом к состоянию коммитирования к дифференцировке, вызываемым мутантными ламинами. Для проверки этой гипотезы была исследована экспрессия генов, регулирующих ранние этапы формирования мышечных волокон – фактора слияния миобластов *Myomaker* (*Mymk*) и миогенного фактора транскрипции миогенина (*MyoG*). Миогенин контролирует слияние миоцитов путем регуляции экспрессии необходимых для этого процесса факторов, в частности, непосредственно связываясь с промотором *Mymk* (Ganassi M. Et al., 2018). Действительно, была обнаружена повышенная экспрессия *MyoG* и *Mymk* как в клетках G232E-LMNA, так и в клетках R482L-LMNA (рис. 2Б).

Для дальнейшего подтверждения этой гипотезы использовали секвенирование транскриптома. Анализ обогащения по функциональной принадлежности выявил значительное усиление путей, связанных с миогенезом, как в образцах G232E-LMNA, так и в образцах R482L-LMNA по сравнению с WT-LMNA в отсутствие дифференцировочных стимулов. Следует отметить, что миобласты с мутацией G232E продемонстрировали значительно более выраженную спонтанную активацию миогенеза по сравнению с R482L-LMNA (рис. 2В).

### 2.3 Транскриптомный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), связанных с миогенной дифференцировочной программой в миобластах.

ДЭГ были проанализированы между всеми возможными парами клеточных линий, с последующей идентификацией связанных с ними биологических функций (рис. 2Г, 2Д). Значительная доля генов с повышенной регуляцией экспрессии как в паре WT/G232E, так и в паре WT/R482L (рис. 2Г) принадлежит путям, регулирующим миогенез (таблица 1). В паре R482L/G232E клетки линии G232E-LMNA также отличались выраженным усилением регуляции сигнальных путей миогенеза.

В совокупности эти данные означают, что миобласты C2C12, содержащие мутации G232E-LMNA и R482L-LMNA, характеризуются сниженной способностью к пролиферации и повышенной экспрессией генов, связанных с программой мышечной дифференцировки, даже в отсутствие дифференцировочных стимулов, с более выраженным эффектом в случае линии G232E-LMNA.



**Рисунок 2. Индуцированные мутациями G232E-LMNA и R482L-LMNA изменения функциональных свойств миобластов C2C12:** (А) Оценка времени удвоения клеточных популяций для трансдуцированных клеточных линий C2C12 WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA в 3 временных точках в течение 72 часов культивирования. Представлены средние значения  $\pm$  SEM ( $n=4$ ,  $**p<0,01$ ); (Б) Экспрессия мРНК генов, регулирующих миогенную дифференцировку, в миобластах C2C12 ( $n=4$ ;  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$ ); (В) Профили функционального обогащения (GSEA, gene set enrichment analysis) набора отличительных генов миогенеза по ранжированным генам, в сравнении между всеми возможными парами миобластов C2C12: WT-LMNA по сравнению с G232E-LMNA, WT-LMNA по сравнению с R482L-LMNA и R482L-LMNA по сравнению с G232E-LMNA ( $p$ -adjusted  $<0,001$ , показаны нормализованные оценки обогащения (NES)); (Г) Количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с повышенной (up) и пониженной (down) регуляцией, обнаруженных во всех трех парах ( $\log_2$  fold change  $>1$ ,  $p$ -adjusted  $<0,01$ ); (Д) Диаграммы Венна для ДЭГ с повышенной регуляцией.

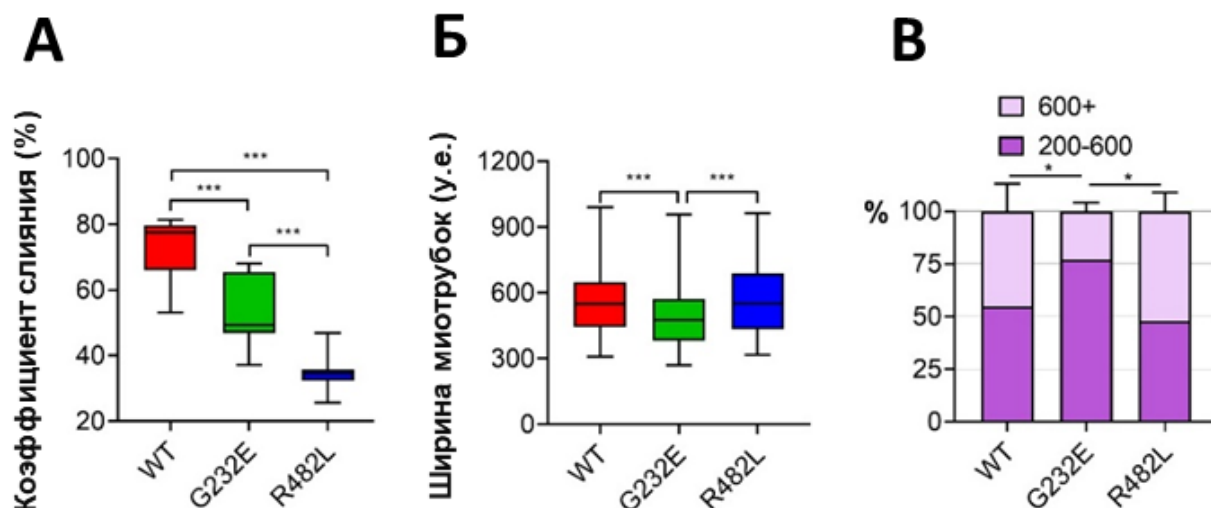
**Таблица 1. Сигнальные пути, контролирующие ключевые процессы развития и функционирования мышечной ткани, ассоциированные с дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ) в контрольной и мутантных трансгенных линиях ( $p < 0.0001$ )<sup>1</sup>**

|  | Количество совпадающих генов |             |                |
|--|------------------------------|-------------|----------------|
|  | WT vs G232E                  | WT vs R482L | R482L vs G232E |
| Миогенез   | 29                           | 15          | 14             |
| Структурно-мышечное развитие                                   | 54                           | 16          | 23             |
| Системные мышечные процессы                                    | 48                           | 20          | 24             |
| Мышечное сокращение  | 41                           | 18          | 21             |
| Дифференцировка поперечно-полосатых мышечных клеток            | 38                           | 11          | 18             |
| Дифференцировка скелетно-мышечных клеток                       | 41                           | 11          | 19             |
| Развитие скелетно-мышечных клеток                              | 30                           | 10          | 14             |
| Сборка миофибрилл  | 20                           | 8           | 11             |
| Сборка клеточных компонентов в морфогенезе                     | 20                           | 8           | 11             |
| Сокращение поперечно-полосатой мускулатуры                     | 20                           | 10          | 10             |
| Формирование анатомической структуры, вовлеченное в морфогенез | 39                           | 14          | 20             |
| Скольжение мышечных филаментов                                 | 13                           | 8           | 7              |
| Структурная организация актомиозинового комплекса              | 20                           | 8           | 11             |
| Процессы, основанные на участии актиновых филаментов           | 31                           | ns          | 15             |
| Организация саркомеров   | 13                           | ns          | 7              |
| Дифференцировка миотрубок                                      | 16                           | ns          | 9              |
| Развитие мышечных волокон                                      | 14                           | ns          | 9              |
| Опосредованное актином клеточное сокращение                    | ns                           | 8           | ns             |
| Регуляция мышечного сокращения                                 | ns                           | 7           | ns             |

<sup>1</sup>Анализ путей был выполнен в отношении ДЭГ с повышенной регуляцией в парах WT/G232E, WT/R482L и R482L/G232E. В таблице представлены биологические функциональные пути с повышенной регуляцией экспрессии. Для анализа использовались базы данных GO (Gene Ontology, базы данных Biological Process и Hallmark), с частотой ложных обнаружений (FDR, false discovery rate) = 0,05; ns (nonsignificant) – несущественно.

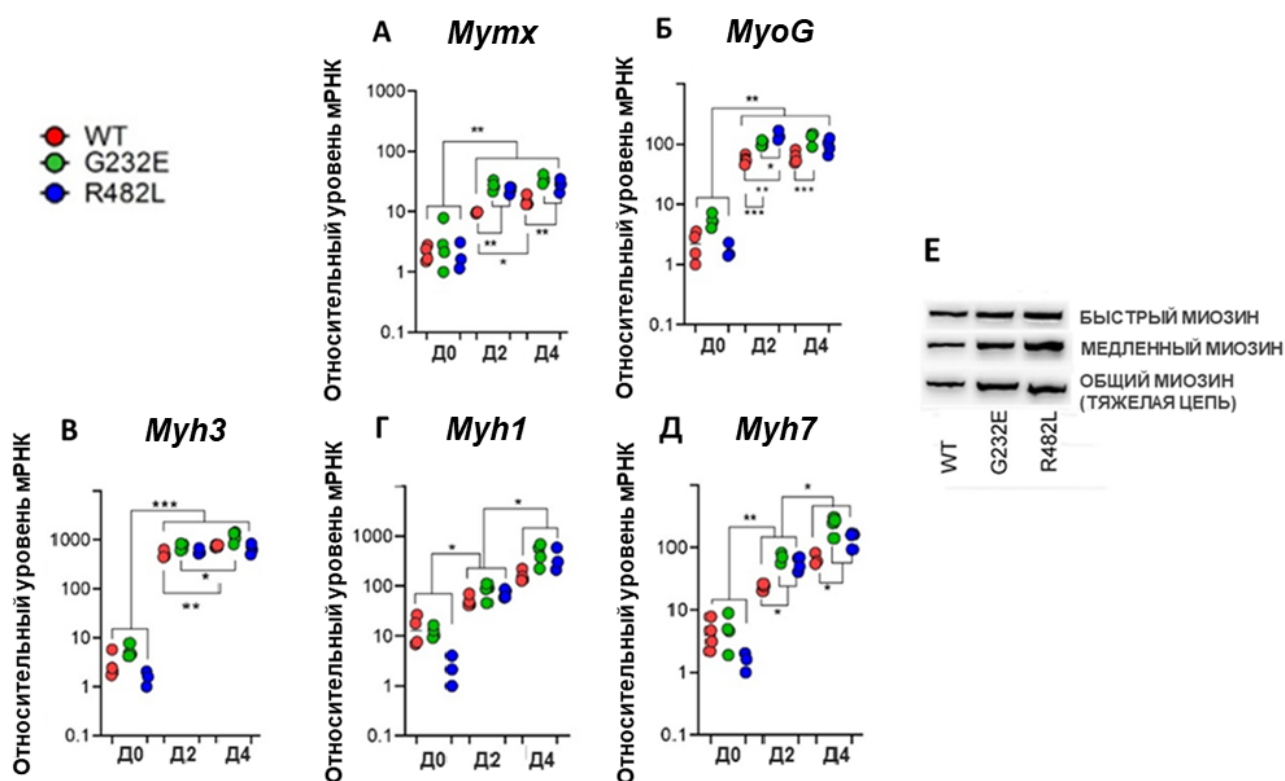
### 3. Влияние мутаций ламина А на миогенную дифференцировку

**3.1 Влияние мутаций ламина А на морфологические и функциональные характеристики миотрубок.** Все три линии трансгенных миобластов одинаково хорошо реагировали на стимулы дифференцировки (рис. 1В). Тем не менее, обнаружились некоторые важные различия. Коэффициент слияния, рассчитанный как количество ядер, включенных в миотрубки, по отношению к общему числу ядер, был самым высоким у линии WT-LMNA и самым низким у линии R482L-LMNA (рис. 3А). Различия касались и морфологии миотрубок. Хотя диапазон ширины миотрубок в культуре был одинаков во всех образцах (рис. 3Б), средняя ширина миотрубок была значительно меньше в линии G232E-LMNA (рис. 3Б), также как фракция крупных массивных миотрубок (рис. 3В).



**Рисунок 3. Морфологические и функциональные характеристики миотрубок, полученных при стимуляции мышечной дифференцировки трансгенных линий WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA. (А) Коэффициент слияния, рассчитанный как процент ядер, включенных в дифференцированные миотрубки (подсчет по независимым фотографиям, n=8); (Б) Ширина миотрубок, оцененная в условных единицах измерения по 5-6 независимым фотографиям. Число миотрубок на каждом фото составляло 10-20; «плавающие» столбики показаны со средним, минимальным и максимальным значениями; (С) Диаграмма, иллюстрирующая фракции «массивных» и «среднестатистических» миотрубок в культурах, на основе их ширины в у.е.; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 (t-тест).**

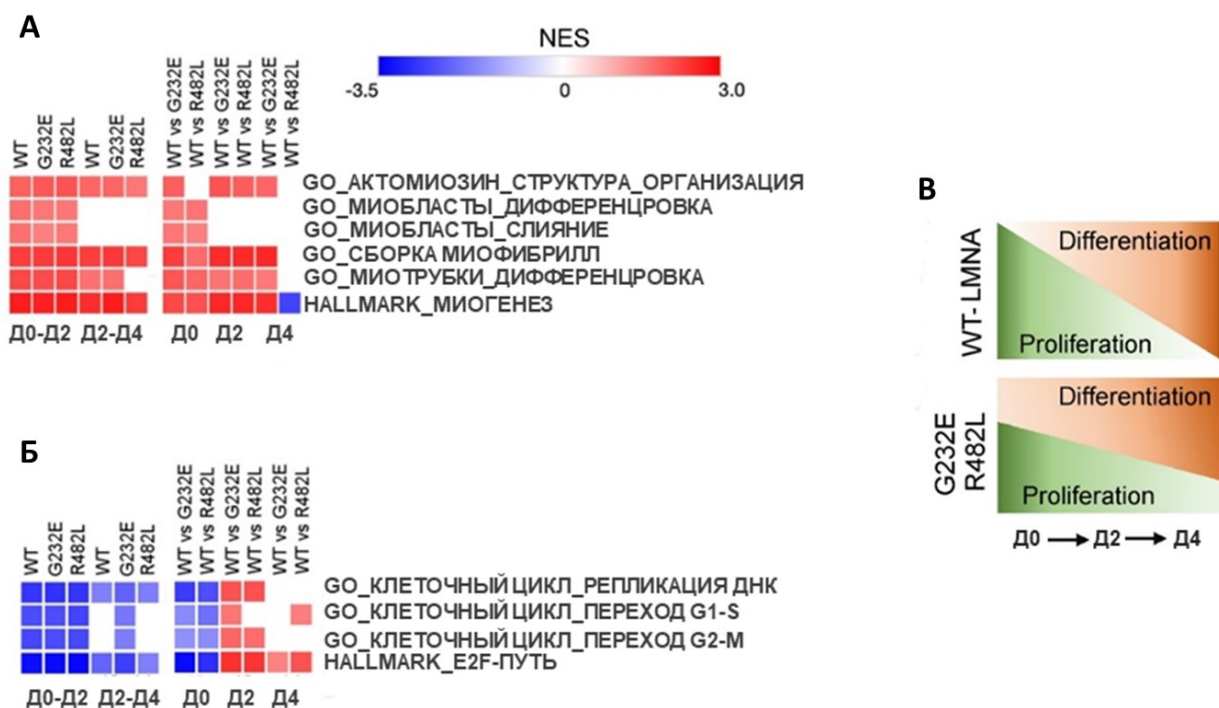
**3.2 Анализ экспрессии тканеспецифичных маркеров при дифференцировке трансгенных линий.** Уровень экспрессии мышечно-специфичных генов *Mutx* (фактора, отвечающего за слияние миобластов) и *Myog*, проанализированный методом ПЦР в реальном времени, оказался значительно выше в мутантных линиях, чем в линии, трансдуцированной ламином дикого типа (рис. 4А, 4Б). Экспрессия мРНК различных изоформ тяжелых цепей миозина оказалась подчинена двум разным закономерностям (рис. 4В-Д). Так, экспрессия эмбриональной изоформы *Myh3* увеличивалась ко второму дню во всех образцах, а затем стабилизировалась на аналогичном уровне (рис. 4В). В то же время экспрессия мРНК взрослых быстрых гликолитических миозинов *Myh1* и медленных окислительных миозинов *Myh7* показала четко выраженное двухступенчатое повышение своего уровня – при переходе от 0 ко 2 дню и от 2 к 4 дню дифференцировки (рис. 4Г, 4Д). При этом экспрессия медленной изоформы на уровне РНК оказалась значительно более высокой в мутантных линиях (рис. 4Д). В подтверждение, представленность белковых изоформ *Myh1/Myh7*, детектированных методом Вестерн-блота, оказалась согласована с паттернами экспрессии мРНК в терминально дифференцированных миотрубках (рис. 4Е). Таким образом, эти данные свидетельствуют в пользу сдвига контроля миогенной программы в сторону активации в мутантных моделях.



**Рисунок 4. Экспрессия мышечно-специфичных маркеров в процессе дифференцировки в трансгенных культурах.** (А-Б) Динамика экспрессии мРНК гена *Myt1x*, контролирующего слияние миобластов, и миогенного регуляторного фактора *MyoG* (n=4; среднее + SEM; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; тест Манна-Уитни); (В-Д) Динамика экспрессии мРНК генов изоформ тяжелой цепи миозина, специфичных для мышечных волокон: *Myh1* – быстрых гликолитических волокон; *Myh7* – медленных оксидативных волокон; эмбриональной изоформы *Myh3* (n=4; среднее + SEM; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; тест Манна-Уитни); (Е) Сравнительный уровень белков-маркеров миогенеза (общего миозина, медленной изоформы *Myh7* и быстрых миозинов *Myh1/Myh2*) в дифференцированных культурах.

**3.3 Анализ транскриптомов трансгенных линий в процессе миогенной дифференцировки.** Анализ транскриптома подтвердил, что все трансгенные линии обладают сходным потенциалом контроля миогенеза с хорошо различимыми ранними и поздними фазами мышечной дифференцировки (рис. 5А, слева). Однако при сравнении мутантных клеточных линий с линией дикого типа по их способности проходить через последовательные стадии миогенеза в них были обнаружены значительные изменения (рис. 5А, справа). Регуляция миогенных путей была значительно усилена в миобластах, несущих мутантные ламины (рис. 5А, справа, день 0), что хорошо согласуется с приведенными выше данными (рис. 2В, таблица 1). Пути, которые контролируют ранние этапы миогенеза, такие как слияние и дифференцировка миобластов, не различались между всеми трансгенными линиями. Но в обеих мутантных линиях оказались активированы пути, которые контролируют формирование и созревание волокон, даже на ранних этапах миогенеза. Эти пути оставались активированными в G232E-LMNA, но не в R482L-LMNA, до конца эксперимента.





**Рисунок 5. Анализ экспрессионных путей, связанных с пролиферацией и миогенезом, в трансгенных культурах.** (А, Б) Результаты анализа обогащения набора генов, визуализированные в виде тепловой карты нормализованных показателей обогащения (NES, normalized enrichment score), которые отображают активируемые и подавляемые пути, относящиеся к контролю миогенеза (А) и динамики клеточного цикла (Б); (В) Обобщенная диаграмма, иллюстрирующая значительную дисрегуляцию в координации пролиферации и дифференцировки в миобластах G232E/R482L-LMNA.

В норме дифференцировка и пролиферация мышечных клеток демонстрируют обратную зависимость, и терминальная дифференцировка сопровождается окончательным выходом из цикла деления. Поэтому возникло предположение, что описанные различия между линиями WT-LMNA и G232E/R482L-LMNA могут быть связаны с нарушением координации выхода из клеточного цикла и дифференцировки. Действительно, обнаружилась обратная взаимосвязь между путями, регулируемыми миогенез и прогрессию клеточного цикла: пути, контролируемые репликацию ДНК и гены-мишени E2F, необходимые для активного клеточного цикла, оказались постоянно подавлены во всех линиях с 0-го по 4-й день. Однако пути, контролируемые G1/S- и G2/M-переходы, были стабилизированы на 2-й день в линиях WT-LMNA и R482L-LMNA, но не в G232E-LMNA (рис. 5Б, слева). Регуляция путей, активирующих прогрессию клеточного цикла, в мутантных пролиферирующих миобластах оказалась подавлена, но существенно повышалась после стимуляции миогенеза как на ранних, так и на поздних стадиях дифференцировки (рис. 5Б, справа).

В совокупности данные свидетельствуют о значительном влиянии мутаций G232E-LMNA и R482L-LMNA на процесс миогенеза в трансгенных миобластах C2C12, которое выражается в том числе в нарушении регуляции баланса процессов пролиферации и дифференцировки (рис. 5В).

#### 4. Влияние экспрессии мутантных ламинов на клеточный метаболизм и митохондриальную биоэнергетику дифференцированных миотрубок C2C12

**4.1 Изменения митохондриальной биоэнергетики дифференцированных клеток под влиянием мутаций ламина А.** Миогенная дифференцировка тщательным образом согласована с регуляцией энергетического метаболизма, поэтому нарушение координации дифференцировочной программы в миобластах C2C12, несущих мутации ламина А G232E/R482L, может сопровождаться изменениями метаболического фенотипа дифференцированных миотрубок G232E/R482L-LMNA.

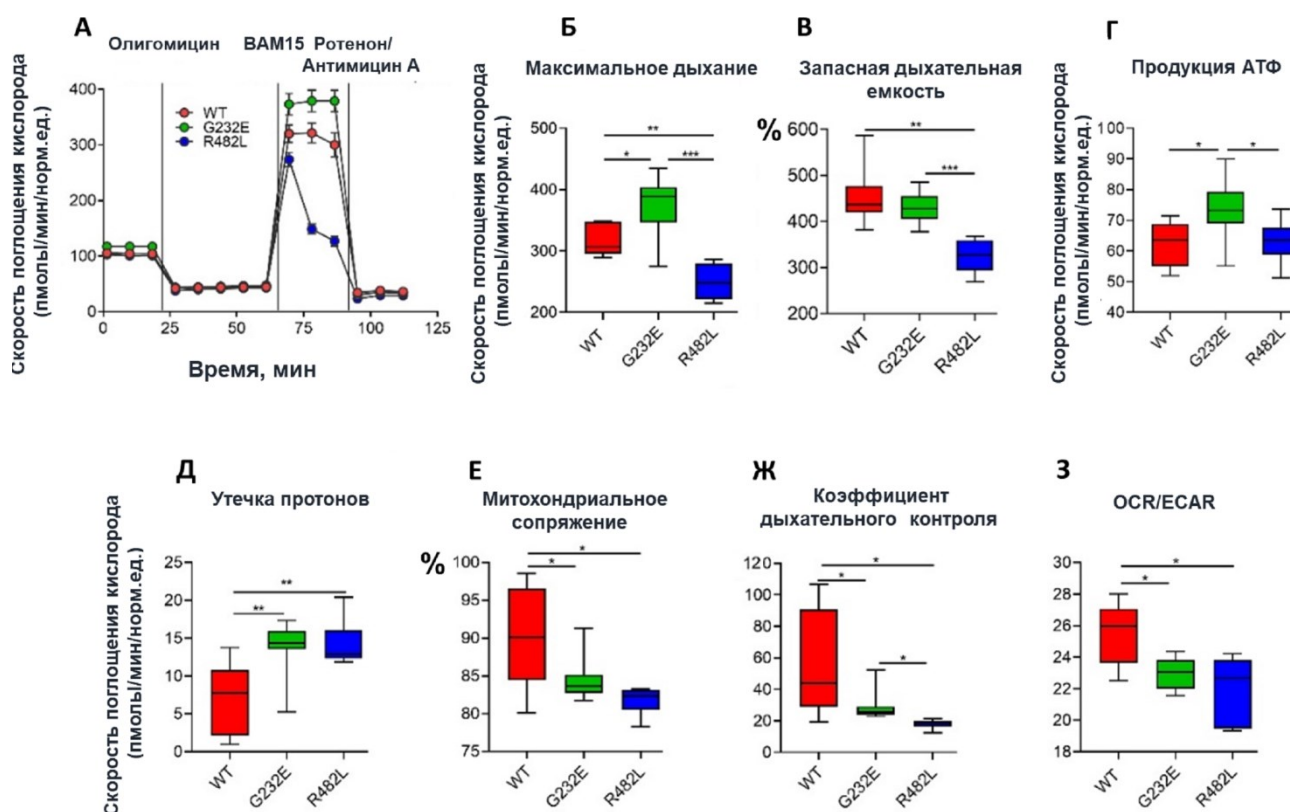
Количественные параметры митохондриального дыхания были оценены по скорости потребления кислорода (OCR, oxygen consumption rate) в дифференцированных культурах WT/G232E/R482L-LMNA с помощью технологии Seahorse (рис. 6А). Максимальное дыхание и резервная дыхательная емкость оказались самыми низкими у линии R482L-LMNA (рис. 6Б, 6В). Это означает, что на исходном уровне митохондрии в этих клетках работают близко к своей максимальной дыхательной способности. Базальное дыхание, показатель энергетических потребностей клетки в исходных условиях, оказалось самым высоким у клеток линии G232E-LMNA (рис. 6А). Максимальная скорость дыхания и АТФ-связанное дыхание в миотрубках этой линии также были значительно выше, чем в миотрубках двух других моделей (рис. 6Б, 6Г). В целом это свидетельствует об увеличении оборота АТФ в этих клетках. Таким образом, усиление митохондриального метаболизма коррелирует с наблюдаемой в этих клетках активацией миогенной программы, которая, при сравнении всех трех линий, наиболее выражена в G232E-LMNA.

Однако увеличение базального и максимального дыхания в дифференцированных клетках этой линии сопровождалось индуцированной утечкой протонов (рис. 6Д). Утечка протонов является преимущественным механизмом, ответственным за неполное сопряжение субстратного окисления и синтеза АТФ, и ее увеличение наблюдалось у обеих мутантных трансгенных линий (рис. 6Д). Кроме того, эффективность митохондриального сопряжения (фракция базального дыхания, используемая для синтеза АТФ) и коэффициент дыхательного контроля (показатель, представляющий состояние митохондриального сопряжения) были значительно ниже в обеих мутантных линиях по сравнению с WT-LMNA (рис. 6Е, 6Ж). В совокупности эти данные могут указывать на разобщающее действие мутаций *LMNA* на митохондриальное дыхание и снижение эффективности окислительного фосфорилирования.

OCR как скорость потребления кислорода определяет активность митохондриальной системы окислительного фосфорилирования (OXPHOS), в то время как внеклеточное закисление среды (ECAR, extracellular acidification rate) является побочным процессом при гликолизе и может, таким образом, служить показателем его интенсивности. По соотношению OCR/ECAR можно оценить относительный вклад гликолиза и митохондриального дыхания в выработку клеточной энергии: высокое соотношение OCR/ECAR указывает на то, что энергия в

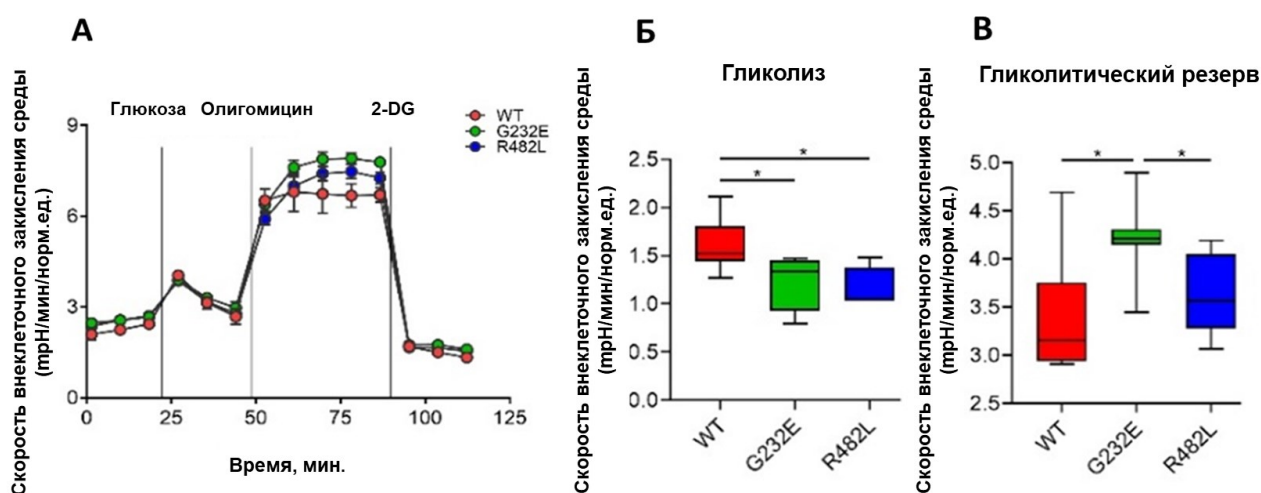
основном вырабатывается за счет митохондриального OXPHOS, тогда как более низкое – за счет гликолиза (Mookerjee et al., 2017). Это соотношение оказалось более высоким у WT-LMNA по сравнению с G232E/R482L-LMNA, что говорит о предпочтении OXPHOS гликолизу в миотрубках с диким типом ламина А (рис. 63).

Таким образом, основываясь на измерениях параметров дыхания, можно сделать вывод, что биоэнергетические профили мутантных моделей отличаются меньшим сопряжением между субстратным окислением и активностью цепи переноса электронов и, следовательно, митохондриальный энергетический аппарат в них работает с меньшей эффективностью.



**Рисунок 6. Стресс-исследование митохондриальной функции в миотрубках C2C12, несущих лентивирусные ламины А человека WT/G232E/R482L-LMNA.** (А) OCR (oxygen consumption rate, скорость поглощения кислорода)-профили для миотрубок, экспрессирующих WT/G232E/R482L-LMNA; (Б–З) Параметры дыхательной функции митохондрий, определенные по профилю OCR: (Б) Максимальное дыхание; (В) Запасная дыхательная емкость; (Г) АТФ-связанное дыхание; (Д) Утечка протонов; (Е) Митохондриальное сопряжение; (Ж) Коэффициент дыхательного контроля; (З) Соотношение OCR/ECAR (extracellular acidification rate, скорость внеклеточного закисления среды) при максимальном дыхании. OCR и ECAR измерялись одновременно. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; t-тест. «Плавающие» столбики отображаются со средним, минимальным и максимальным значениями.

**4.2 Изменение гликолитической активности дифференцированных клеток под влиянием мутаций ламина А.** Параметры ECAR как показателя интенсивности процессов гликолиза были измерены в дифференцированных культурах WT/G232E/R482L-LMNA с применением технологии Seahorse (рис. 7А). Миотрубки G232E/R482L-LMNA продемонстрировали снижение скорости гликолиза по сравнению с линией WT-LMNA (рис. 7Б). В то же время дифференцированные клетки линии G232E-LMNA обладают наибольшим гликолитическим резервом (рис. 7В). Можно заключить, что, в отличие от R482L-LMNA, миотрубки с мутацией G232E-LMNA, в дополнение к усилению АТФ-связанного дыхания, поддерживают неиспользованный резерв гликолитической емкости для быстрой выработки энергии в случае ее дефицита. В совокупности эти результаты указывают на измененные метаболические свойства линий G232E-LMNA и R482L-LMNA по сравнению с WT-LMNA.

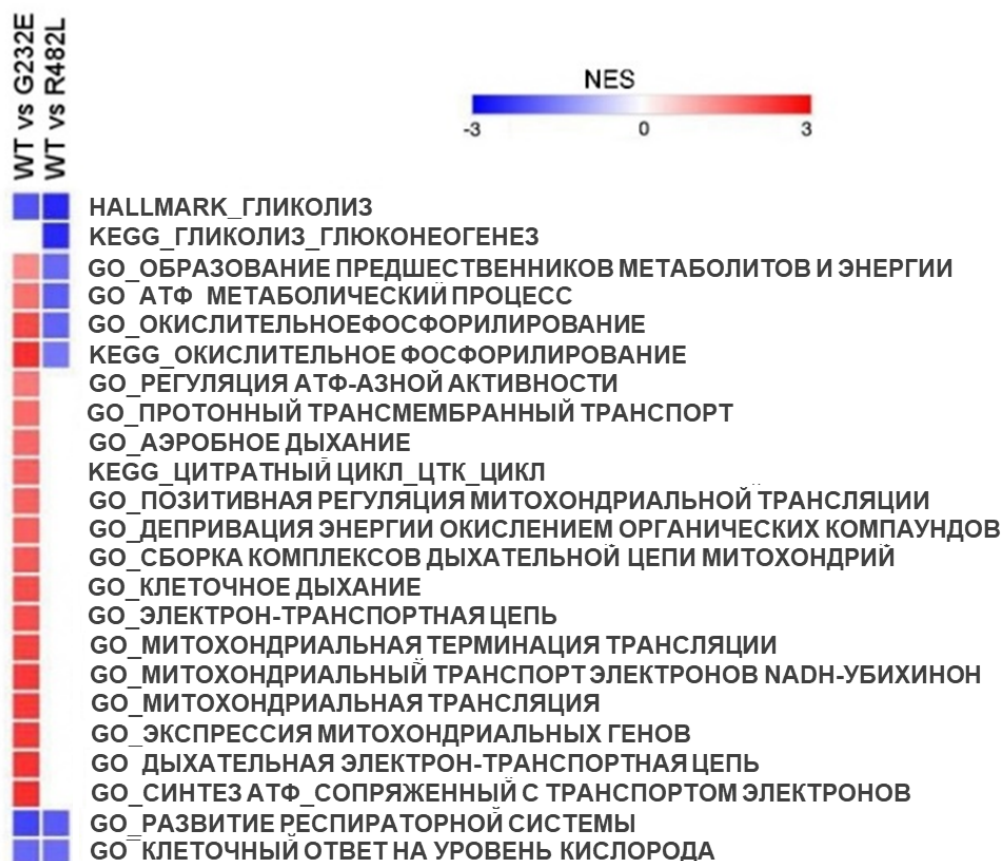


**Рисунок 7. Стресс-исследование гликолитической активности миотрубок C2C12, несущих лентивирусные ламины А человека WT/G232E/R482L-LMNA.** (А) Кинетические профили ECAR (extracellular acidification rate, внеклеточное закисление среды) миотрубок, экспрессирующих WT/G232E/R482L-LMNA. ECAR измерялся в режиме реального времени, как показано; 2-DG – 2-дезоксид-Д-глюкоза. Параметры гликолитической функции, определенные по профилю ECAR: (Б) Гликолиз и (В) Гликолитическая резервная емкость. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; t-тест. «Плавающие» столбики отображаются со средним, минимальным и максимальным значениями.

**4.3 Транскриптомный анализ сигнальных путей, регулирующих клеточную биоэнергетику.** Сравнительный анализ экспрессионных путей, регулирующих клеточную биоэнергетику в дифференцированных миотрубках, также выявил множественные значительные изменения в мутантных трансгенных линиях, и эти результаты хорошо подтверждают данные, полученные в функциональных экспериментах (рис. 8). Экспрессионные пути, регулирующие гликолиз, а также клеточный ответ на уровни кислорода, были подавлены в обеих мутантных линиях по

сравнению с линией WT-LMNA. Регуляция путей, которые контролируют различные стадии аэробного дыхания и окислительного фосфорилирования, оказалась либо повышена в линии G232E-LMNA и снижена в линии R482L-LMNA по сравнению с линией WT-LMNA, либо повышена в линии G232E-LMNA по сравнению с линиями WT-LMNA и R482L-LMNA.

Таким образом, исследование биоэнергетических профилей и анализ транскриптома продемонстрировали специфические для мутаций *LMNA* изменения метаболического статуса клеток скелетной мускулатуры.



**Рисунок 8.** Тепловая карта значений NES (нормализованных показателей обогащения) после GSEA (анализа обогащения набора генов), представляющая метаболические пути с повышенной или пониженной регуляцией в мюотрубках G232E/R482L-LMNA по сравнению с WT-LMNA. FDR=0,05.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе использована комбинация функциональных экспериментов *in vitro* и анализа транскриптома, для того чтобы определить, как две мутации *LMNA*, ассоциированные с разными клиническими фенотипами скелетно-мышечных ламинопатий, влияют на рост, дифференцировку и метаболизм клеток скелетной мускулатуры.

С использованием экспериментальной клеточной модели впервые продемонстрировано, что обе мутации – как G232E, так и R482L-LMNA – нарушают скоординированную регуляцию путей, контролирующую динамику клеточного цикла и миогенную дифференцировку. Также установлено, что мутации R482L/G232E-LMNA влияют на эффективность сопряжения субстратного окисления и синтеза АТФ в митохондриях и гликолитическую активность дифференцированных мышечных клеток. Все эти изменения могут способствовать развитию мышечных патологий, обусловленных мутациями ламина А.

Дифференцировка мышечных клеток включает в себя существенное перепрограммирование генетических экспрессионных профилей, сопровождающееся изменением формы и состояния клеток. Мутации ламина А G232E и R482L специфическим образом изменяют профили экспрессионных путей, регулирующих пролиферацию и миогенез, и вызывают глобальные нарушения в координации миогенной дифференцировочной программы. Миобласты C2C12, несущие эти мутации, демонстрируют снижение пролиферативного потенциала и спонтанную активацию про-миогенной программы, сопровождаемую задержкой подавления клеточного цикла после стимуляции миогенеза. Эти отклонения проявляются в нарушении координации поздних стадий дифференцировки миоцитов и наблюдаемых изменениях морфологии контрактильных миотрубок в культуре. В отличие от других тканей и органов, состоящих из терминально дифференцированных постмитотических клеток (например, сердечной мышцы), скелетная мускулатура обладает значительной регенеративной способностью. В связи с этим детальное понимание молекулярных механизмов взаиморегуляции пролиферативной и дифференцировочной программ необходимо как основа для разработки методов экспериментального манипулирования миогенными прогениторными клетками, с целью их будущего терапевтического применения. Полученные данные, таким образом, служат расширению представлений о координации основных клеточных программ и ее нарушениях в результате патологических мутаций.

В основе искажений экспрессионных профилей моделей могут лежать изменения во взаимодействии мутантных ламинов с хроматином и формировании ламин-ассоциированных доменов. Это определяет в качестве перспективы дальнейших исследований изучение организации хроматиновых доменов и эпигенетического ландшафта – модификаций ДНК и гистонов – в модельных клетках. В настоящее время ни для одного клеточного типа мы не представляем полной картины регуляции экспрессионной программы, определяющей клеточный фенотип и его изменения в патологиях. Выявленные в настоящем исследовании нарушения в транскрипционной регуляции метаболических и дифференцировочных путей в мышечных клетках, несущих мутации ламина А, сопровождаются общими и специфическими для мутаций изменениями миогенной дифференцировки, структуры ядерной ламина, клеточного метаболизма и функционирования митохондрий. Сопоставление изменений в транскриптоме с профилями эпигенетических меток и взаимодействий ламина А с ДНК позволит составить

комплексную картину экспрессионной регуляции в мышечных клетках в норме и в присутствии патологических мутаций ламина, что расширит представление о координации клеточной экспрессионной программы и структурно-функциональной организации клетки.

Важным открытием, сделанном в этом исследовании, являются выявленные нарушения биоэнергетики мышечных клеток. В совокупности результаты функциональных экспериментов и экспрессионного анализа доказывают изменения митохондриальной и гликолитической активности в клеточных моделях G232E/R482L-LMNA, которые свидетельствуют об ухудшении их биоэнергетического здоровья. В настоящем исследовании впервые показано, что мутации ламина А по-разному влияют на митохондриальную биоэнергетику дифференцированных мышечных клеток, и изменения метаболического фенотипа согласуются с изменениями в экспрессии генов соответствующих метаболических путей. Обнаруженные различия в активности клеточных метаболических/биоэнергетических систем между двумя мутантными моделями могут дать новое представление об ассоциации генотип-фенотип при ламинопатиях.

В связи с тем, что скелетная мускулатура является важнейшим метаболическим органом, уникальным в отношении энергетического обмена, полученные данные относительно метаболических изменений в клетках скелетной мускулатуры в патологических условиях представляют особую ценность для теоретического знания и будущего практического применения в профилактических и лечебных целях. Описанные в работе изменения метаболического фенотипа мышечных клеток, будучи, без сомнения, вовлечены в патогенез и развитие скелетно-мышечных патологий, служат привлекательной мишенью при создании подходов к их терапии. Модуляция митохондриальной биоэнергетики и метаболическое репрограммирование представляются перспективными направлениями для разработки терапевтических стратегий при лечении скелетно-мышечных заболеваний, включая ламинопатии.

В целом, результаты исследования относительно влияния мутаций ламина А на свойства мышечных клеток демонстрируют перспективность дальнейшего использования полученных и охарактеризованных клеточных моделей для изучения механизмов экспрессионной регуляции и их изменений, лежащих в основе ламинопатий и их фенотипических проявлений. Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярно-клеточных механизмов, участвующих в патогенезе скелетно-мышечных ламинопатий, и могут дать направление развитию методов генной и клеточной терапии этих заболеваний.

## **ВЫВОДЫ**

1. Мутации G232E и R482L ламина А вызывают изменения в морфологии клеточных ядер и пролиферативной активности миобластов мышцы C2C12.
2. Экспрессия мутантных ламинов G232E и R482L индуцирует спонтанную активацию про-миогенной программы в миобластах мышцы C2C12 и нарушает

- согласованную регуляцию механизмов контроля динамики клеточного цикла и дифференцировки при индукции миогенеза.
3. При дифференцировке мышечных клеток в присутствии мутаций G232E и R482L ламина А изменяется динамика экспрессии тканеспецифичных маркеров и снижается количество миобластов, участвующих в формировании многоядерных миотрубок, что наиболее выражено в клетках с мутацией R482L. При этом дифференцированные миотрубки с мутацией G232E ламина А отличаются статистически достоверным уменьшением морфологических параметров.
  4. Обе мутации оказывают разобщающее действие на митохондриальное дыхание и частично ингибируют переключение клеточного метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование при мышечной дифференцировке.
  5. Мутации G232E и R482L ламина А изменяют метаболический фенотип дифференцированных культур C2C12. Экспрессия ламина с мутацией R482L сопровождается подавлением, а G232E – активацией окислительного метаболизма, с сопутствующей митохондриальной дисфункцией. Обе мутации приводят к снижению активности процессов гликолиза в дифференцированных миотрубках.
  6. Наблюдаемые различия в митохондриальной и гликолитической активности дифференцированных культур C2C12, несущих мутантные ламины, согласуются с изменениями в экспрессии генов соответствующих метаболических путей.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science

1. **Ignatieva E.** Skeletal Muscle Mitochondria Dysfunction in Genetic Neuromuscular Disorders with Cardiac Phenotype / Ignatieva E., Smolina N., Kostareva A., Dmitrieva R. // International journal of molecular sciences – 2021. – Vol. 22 – № 14 – P.7349.
2. **Ignatieva E. V.** LMNA Mutations G232E and R482L Cause Dysregulation of Skeletal Muscle Differentiation, Bioenergetics, and Metabolic Gene Expression Profile / Ignatieva E. V., Ivanova O.A., Komarova M.Y., Khromova N. V., Polev D.E., Kostareva A.A., Sergushichev A., Dmitrieva R.I. // Genes – 2020. – Vol. 11, – № 9 – P.1057.
3. Perepelina K. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling / Perepelina K., Dmitrieva R., **Ignatieva E.**, Borodkina A., Kostareva A., Malashicheva



- A. // *Biochemistry and Cell Biology* – 2018. – Vol. 96 – № 3 – P.342-348.
4. Malashicheva A. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner / Malashicheva A., Bogdanova M., Zibirnyk A., Smolina N., **Ignatieva E.**, Freilikhman O., Fedorov A., Dmitrieva R., Sjöberg G., Sejersen T., Kostareva A. // *Molecular Genetics and Metabolism* – 2015. – Vol. 115 – № 2–3 – P.118-127.
  5. Богданова М. А. Роль ядерных ламинов А/С в остеогенной дифференцировке мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / Богданова М. А., Гудкова А. Я., Забирник А. С., **Игнатъева Е. В.**, Дмитриева Р. И., Смолина Н. А., Костарева А. А., Малашичева А. // *Цитология* – 2014. – Т. 56 – №4 – С.260-267.

#### **Тезисы докладов:**

1. Комарова М.Ю. C2C12 как модель для изучения энергетического обмена в скелетной мускулатуре / Комарова М.Ю., **Игнатъева Е.В.**, Дмитриева Р.Д. // *Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии* – 2019. – С. 151-152.
2. Комарова М.Ю. C2C12 как модель для изучения дегенерации мышечного волокна при ламинопатиях / Комарова М.Ю., Иванова О.А., **Игнатъева Е.В.**, Дмитриева Р.Д. // *Гены и клетки* – 2019. – Т.14. – № 5 – С.115-116.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ECAR (extracellular acidification rate) – скорость внеклеточного закисления среды

FDR – (false discovery rate) частота ложных обнаружений

GSEA (gene set enrichment analysis) – анализ обогащения набора генов

NES (normalized enrichment score) – нормализованные оценки обогащения

OCR (oxygen consumption rate) – скорость потребления кислорода

OXPPOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование

SEM (standard error mean) – стандартная ошибка среднего