

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ИГНАТЬЕВА
Елена Владимировна

**Влияние мутаций гена ламина А G232E и R482L
на дифференцировку и метаболизм клеток скелетной мускулатуры**

1.5.22 – клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н. Дмитриева Рената Игоревна

Санкт-Петербург

2022 год

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Структура и функции ламинов	13
1.1.1 Структура ламинов	13
1.1.2 Функции ламинов	15
1.2 Мутации ламина A/C и ламинопатии	19
1.2.1 Мутации ламина A/C	19
1.2.2 Механизмы развития ламинопатий	23
1.2.3 Скелетно-мышечные ламинопатии	26
1.2.4 Участие ламины в скелетно-мышечной дифференцировке	33
1.3 Метаболические и митохондриальные нарушения при ламинопатиях	37
1.3.1 Роль митохондриальной биоэнергетики в функционировании скелетной мускулатуры	37
1.3.2 Митохондриальная дисфункция при нервно-мышечных заболеваниях, вызванных мутациями в структурных белках миоцитов	39
1.3.3. Влияние мутаций ламина A/C на метаболизм	43
2. МЕТОДОЛОГИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Описание клеточной модели	45
2.2 Материалы	47
2.2.1 Химические реактивы	47
2.2.2 Буферные растворы	48
2.2.3 Антитела	49
2.2.4 Среды и реагенты для работы с культурами клеток	50
2.2.5 Наборы реактивов	50
2.3 Методы исследования	51
2.3.1 Культивирование и дифференцировка клеток	51
2.3.2 Пересев и заморозка клеток	51
2.3.3 Плазмиды и мутагенез	51
2.3.4 Производство лентивируса, трансдукция и получение постоянных клеточных линий	53
2.3.5 Анализ клеточной пролиферации	54
2.3.6 Иммуноцитохимическое окрашивание	55

2.3.7 Прижизненное окрашивание митохондрий	55
2.3.8 Анализ морфологических характеристик дифференцированных миотрубок	55
2.3.9 Иммуноблоттинг	56
2.3.10 Относительная количественная оценка содержания митохондриальной ДНК с использованием ПЦР в реальном времени	56
2.3.11 Выделение РНК и обратная транскрипция	57
2.3.12 ПЦР в режиме реального времени	58
2.3.13 Митохондриальный стресс-тест	59
2.3.14 Гликолизный стресс-тест	60
2.3.15 Конструирование библиотек и секвенирование РНК	60
2.3.16 Обработка данных РНК-секвенирования	61
2.3.17 Статистическая обработка данных	62
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	63
3.1 Получение и валидация экспериментальной клеточной модели	63
3.1.1 Верификация экспрессии трансгенов	64
3.1.2 Исследование влияния экспрессии мутантных ламин на морфологию ядер	64
3.1.3 Миогенная дифференцировка трансгенных линий	64
3.2 Влияние мутаций на функциональные свойства миобластов C2C12.....	67
3.2.1 Анализ пролиферативной активности миобластов, несущих мутантные ламینیны	67
3.2.2 Анализ экспрессии ключевых генов, регулирующих ранние стадии миогенеза.....	67
3.2.3 Транскриптомный анализ ДЭГ, связанных с миогенной дифференцировочной программой в миобластах	67
3.3 Влияние мутантных ламин на эффективность и динамику дифференцировки миобластов C2C12.....	70
3.3.1 Влияние мутаций ламина на морфологические и функциональные характеристики миотрубок	70
3.3.2 Анализ экспрессии тканеспецифичных маркеров миогенеза при дифференцировке трансгенных линий	71
3.3.3 Анализ транскриптомов трансгенных линий в процессе миогенной дифференцировки	72

3.4 Влияние экспрессии мутантных ламинов на клеточный метаболизм и митохондриальную биоэнергетику дифференцированных миотрубок C2C12	75
3.4.1 Исследование клеточной биоэнергетики дифференцированных культур <i>WT/G232E/R482L-LMNA</i>	75
3.4.2 Стресс-исследование гликолиза	77
3.4.3 Транскриптомный анализ экспрессионных путей, регулирующих клеточную биоэнергетику	78
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ	90
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	92
ПРИЛОЖЕНИЕ	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ламины (A, B1, B2 и C) – белки промежуточных филаментов, главный компонент ядерной ламины – фибриллярной ячеистой структуры, расположенной на нуклеоплазматической стороне внутренней ядерной мембраны и играющей роль каркаса клеточного ядра. Первоначально считалось, что ламины выполняют в клетке исключительно структурную функцию (и эта их функция наиболее изучена), поскольку именно ламина поддерживает форму и определяет механические свойства клеточного ядра. Однако к настоящему времени накоплено много экспериментальных данных, которые свидетельствуют о том, что ламины задействованы во многих других специализированных клеточных функциях. Находясь под внутренней ядерной мембраной, ламина 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 ламина A/C (*LMNA*, этот ген кодирует ламины A-типа и в результате альтернативного сплайсинга производит две различные мРНК, кодирующие соответственно преламин A и ламин C) и около полутора десятков ассоциированных с ними клинических расстройств. На сегодняшний день это наибольшее количество мутаций, известных для одного гена. Наряду с генетической вариабельностью, для этих заболеваний характерно чрезвычайное клиническое многообразие. Поражаются преимущественно ткани мезенхимального происхождения, при этом ламинопатии могут затрагивать различные ткани как изолированно (скелетные мышцы и миокард, жировая ткань, периферические нервы), так и системно (как это происходит при синдроме преждевременного старения). Неразгаданным научным феноменом остается то, каким образом мутации гена, экспрессирующегося практически во всех дифференцированных соматических клетках, приводят к возникновению клинически столь вариабельных расстройств, к тому же тканеспецифичных.

Подавляющее большинство мутаций гена *LMNA* (79,1%) связано с заболеваниями поперечно-полосатой мускулатуры [1]. Превалирующим типом являются миссенс-мутации, или

точечные мутации, приводящие к аминокислотным заменам. При этом между клинической картиной и/или видом и локализацией мутации в гене не обнаруживается четкой корреляции.

Механизмы действия мутаций практически не изучены. Одна из гипотез объясняет тканеспецифичность проявления мутаций ламинов с позиций их структурной роли в клетке: миоядра, экспрессирующие мутантные ламины, более хрупки и чувствительны к физическим стрессорам, что критично для ткани, постоянно подверженной механическому стрессу, которой является поперечно-полосатая мускулатура. Другие модели сфокусированы на регуляторных функциях ламинов и строятся на предположении, что мутации ламина A/C изменяют нормальные профили экспрессии генов либо непосредственно через взаимодействие с хроматином, либо косвенно путем нарушения межбелковых взаимодействий (возможно, с неизвестными пока тканеспецифичными партнерами ламинов). Очевидно, что ни одна из теорий не объясняет отсутствия четкой взаимосвязи генотип-фенотип и разнообразия проявления мутаций в гене *LMNA*.

Если исходить из роли ядерной ламины в организации и регуляции генома, изучение механизмов функционирования разных мутантных форм ламинов является частью решения, возможно, самой масштабной биологической проблемы – получения комплексного представления о регуляции экспрессии генов в разных типах клеток. Подробное изучение этого актуального научного вопроса (который, вероятно, еще долго будет оставаться предметом внимания фундаментальной науки, в силу своей масштабности) позволит приблизиться 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. В настоящее время клинические испытания у пациентов со скелетно-мышечными ламинопатиями не проводятся (<http://clinicaltrials.gov/>), и 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. Подробное знание картины молекулярных процессов и функциональных изменений клеток, приводящих к развитию скелетно-мышечных ламинопатий, в свою очередь, необходимо как основа для разработки методов диагностики и терапии этих заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Мутация в гене ламина А/С была впервые выявлена у пациента с мышечной дистрофией в 1999 году. С того времени количество описываемых мутаций стремительно растет. Однако прогресс в изучении молекулярных механизмов действия мутаций отстает от процесса описания новых. 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 [2], [3], [4]. С этим согласуются наблюдения аномалий (а именно ингибирования) дифференцировки в миобластах, несущих разные мутации ламина А, *in vitro* [5], [6], [7]. 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 [8]. Единичные работы предоставили доказательства участия ламина А в регуляции энергетических и метаболических путей, и все они в качестве модельного объекта использовали неммышечные клетки – фибробласты [9], [10], [11] либо клетки HeLa [12]. 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 [13]. Оно выявило нарушения в окислении жирных кислот и глюкозы в скелетных мышцах *in vivo* и в культивируемых миотрубках, полученных от пациентов с *LMNA*-ассоциированными скелетно-мышечными нарушениями, *in vitro*, 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 метаболических изменений в клетках скелетной мускулатуры, несущих мутантный ламин А.

В настоящей работе для исследования свойств мышечных клеток в присутствии мутаций ламина А/С 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. Согласно имеющимся сведениям, эти мутантные формы ламина различаются по своим молекулярным фенотипам. Известно, что мутация G232E разрушительно влияет на сборку ламиновой сети [14], [15], тогда как при мутантной замене в 482 положении белка ламина A/C не выявляется серьезных отклонений в его стабильности или локализации [16]. Очевидно, что молекулярные механизмы действия этих двух мутаций различны, что приводит к разным клиническим проявлениям их в скелетной мускулатуре.

Цель

Исследовать влияние мутаций ламина A G232E и R482L, ассоциированных со скелетно-мышечными ламинопатиями, на рост, дифференцировку и метаболизм клеток скелетной мускулатуры.

Задачи

1. Получить и охарактеризовать экспериментальную клеточную модель на основе линии миобластов мышцы C2C12 со стабильной экспрессией ламина A человека дикого типа и с мутациями G232E/R482L.
2. Оценить влияние экспрессии ламина A, несущего мутации G232E и R482L, на морфологию ядер и пролиферативные характеристики миобластов.
3. Изучить воздействие мутаций G232E и R482L ламина A на формирование дифференцированных мышечных клеток и их морфологию.
4. Исследовать влияние мутаций G232E и R482L ламина A 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, одновременно проведено комплексное исследование транскриптома и функциональных свойств миобластов и дифференцированных миотрубок. Впервые исследовано влияние мутаций G232E и R482L на экспрессионный профиль молекулярных путей, задействованных в регуляции мышечной дифференцировки и клеточного

метаболизма, а также функциональные характеристики миотрубок, несущих ламины с данными мутациями.

Как известно, миогенная дифференцировка требует скоординированной реализации двух ключевых клеточных программ: выхода из клеточного цикла и индукции миогенеза. Путем анализа транскриптома 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 ламина А/С получено с применением технологии РНК-секвенирования, что позволило осуществить детальный анализ профилей экспрессии задействованных клеточных путей.

Новизна представленного цикла исследований заключается также в получении новых 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 развития патологий, ассоциированных с мутациями. Полученные данные подтверждают перспективность исследования метаболического статуса мышечных типов клеток при поражениях скелетной мускулатуры. Впервые показано различие в соотношении двух основных энергообразующих путей (митохондриального дыхания и гликолиза) у *LMNA*-мутантных миогенных линий, что может служить диагностическим критерием для определенного клеточного фенотипа. Это открытие безусловно важно для установления генотип-фенотипических связей при моделировании, диагностике и разработке лечения нервно-мышечных заболеваний, обусловленных мутациями в гене ламина А/С.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результат работы – комплексный анализ изменений экспрессии набора генов, вовлеченных в мышечную дифференцировку и энергетический метаболизм в миобластах и дифференцированных миотрубках с мутантными ламинами, подкрепленный данными функциональных экспериментов, что крайне важно и для фундаментальной науки, и для разработки практических подходов к терапии скелетно-мышечных ламинопатий. Изменения в экспрессии генов, отражающиеся в нарушениях дифференцировки и клеточной биоэнергетики, – составляющая многофакторного процесса развития скелетно-мышечных патологий, в основе которого лежат нарушения главных клеточных функций. Выявление молекулярных дефектов, вызванных действием мутаций ламина А, позволит приблизиться к разработке эффективных методов диагностики и терапии ламинопатий, ассоциированных с поражениями скелетной мускулатуры.

Важная часть работы – идентификация изменений биоэнергетики дифференцированных миотрубок вследствие мутаций в гене ламина А. 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 поперечно-полосатой мускулатуры. Поскольку нарушения энергетического баланса в мышечной ткани основываются на абберациях клеточной биоэнергетики, представляется чрезвычайно значимым обнаружение ассоциированных с патологией конкретных метаболических изменений в миотрубках, несущих мутации ламина А.

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 миобластов мышцы С2С12. 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), молекулярных (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 рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science. Апробация работы была проведена на заседании Проблемной комиссии по клеточной и молекулярной биологии, генетике № 2 Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации 29.06.2022. Достоверность результатов обосновывается использованием современных высокотехнологичных методов исследования, а также применением статистических методов анализа полученных данных. Положения работы представлены в виде 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). Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, результаты вошли в отчет по гранту 16-15-10178.

Личный вклад автора

Экспериментальная клеточная модель получена непосредственно автором; большая часть экспериментальных процедур также проведена автором лично. Кроме того, личный вклад автора заключается в обширном анализе данных литературы, результаты которого опубликованы в международном рецензируемом журнале. 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 РФ 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.

Структура и объем 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ЛАМИНОВ

1.1.1 Структура ламинов

Оболочка клеточных ядер многоклеточных животных включает три основных составляющих: наружную и внутреннюю ядерные мембраны, разделенные перинуклеарным пространством и пронизанные комплексами ядерных пор, и тонкую (10-30 нм толщиной) белковую сетку, подстилающую внутреннюю ядерную мембрану – ядерную ламину (рисунок 1).



Рисунок 1. Строение ядерной оболочки. Наружная и внутренняя ядерная мембраны разделены перинуклеарным пространством. Их пронизывают комплексы ядерных пор, связывая нуклеоплазму и цитоплазму. Внутреннюю ядерную мембрану подстилает ядерная ламина - белковая сетка 10-30 нм толщиной (адаптировано из <http://basicmedicalkey.com>).

Основными компонентами ядерной ламины являются фибриллярные белки ламины. Эти белки консервативны от дрожжей до млекопитающих. Клетки млекопитающих имеют два типа ламинов – А и В, с фундаментально разными свойствами. Ламины А-типа (А и С) являются альтернативно сплайсированными продуктами гена *LMNA* и экспрессируются в большинстве дифференцированных соматических клеток. Ламины В-типа (В1 и В2), кодируемые соответственно генами *LMNB1* и *LMNB2*, экспрессируются во время эмбрионального развития и затем повсеместно во всех типах клеток млекопитающих. Кроме того, существуют три

минорных изоформы – продукты альтернативного сплайсинга этих же генов, в частности, в половых клетках.

Ламины относятся к V классу промежуточных филаментов (ПФ) на основе гомологии последовательностей. Подобно другим белкам ПФ, молекулы ламинов имеют массу 60-89 kDa и трехчленную структуру с центральным α -стержневым доменом, включающим четыре субспиральных поддомена, которые содержат гептапептидные повторы и обозначаются как спирали 1A, 1B, 2A, 2B (рисунок 2). Спирали соединены тремя гибкими линкерными сегментами. Центральный стержневой домен ограничен неспирализованными N-концевым (головным) и C-концевым (хвостовым) доменами. Хвостовой домен содержит сигнал ядерной локализации (NLS, Nuclear Localization Signal); структурный мотив, схожий с иммуноглобулиновым S-изгибом (Ig-fold); и C-концевой CaaX-мотив (C, цистеин; а, алифатическая аминокислота; X, любая аминокислота), который присутствует в ламинах A, B1 и B2, но не C.

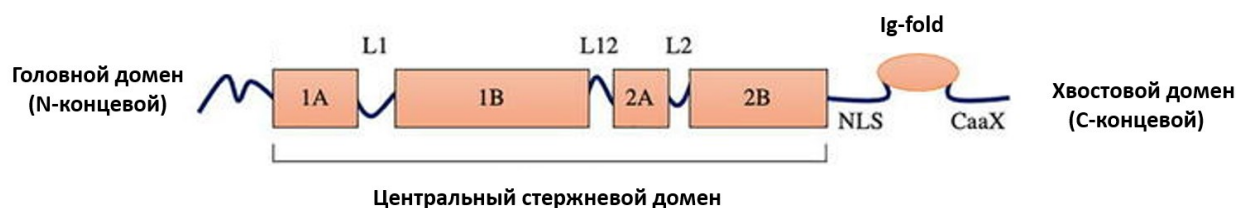


Рисунок 2. Общая структура молекулы ламины. Мономер филамента ядерных ламинов состоит из N-концевого (головного) домена; центрального стержневого домена, который включает четыре α -спиральных поддомена (1A, 1B, 2A и 2B) и три гибких линкерных сегмента (L1, L12 и L2); и C-концевого (хвостового) домена, который содержит сигнал ядерной локализации (NLS, Nuclear Localization Signal), глобулярный иммуноглобулиновый Ig-fold и CAAХ-мотивы (адаптировано из [17]).

Ламины экспрессируются в виде преламинов, которые перед сборкой филаментов претерпевают множественные посттрансляционные модификации, специфичные для каждого типа ламинов и являющие собой очевидный механизм для их регуляции [17]. Наиболее изученные из модификаций касаются карбокситерминального CaaX-мотива и представляют собой серию этапов, включающих фарнезилирование и карбоксилирование. Функциональные последствия модификаций остаются большей частью неясными [18].

Подобно большинству белков ПФ, мономерные ламины полимеризуются, образуя структуры более высокого порядка. *In vitro* из суперскрученных гомодимеров по принципу «голова к хвосту» формируются линейные филаменты около 10 нм в диаметре [19]. О фактической организации ламиновой сети из филаментов *in vivo* известно крайне мало. А- и В-ламины взаимодействуют *in vitro*, но в клетке, по-видимому, образуют независимые филаментозные сети. Фракция ламинов (вероятно, более растворимая и менее полимеризованная) присутствует не только под ядерной мембраной, но и в нуклеоплазме, за исключением ядрышек; в большей степени это ламины А-типа. Нуклеоплазматические ламины А и В также образуют отдельные, но взаимодействующие структуры [20]. Нуклеоплазматические ламиновые структуры стабильны, но об их организации известно еще меньше, чем об устройстве периферической ламины.

1.1.2 Функции ламинов

Будучи структурными белками ПФ, ламины выполняют в первую очередь именно структурную функцию (и эта их функция наиболее хорошо изучена), поскольку ламиновая сетка играет роль «каркаса» клеточного ядра. Именно ламина обеспечивает структурную поддержку ЯО и механическую стабильность ядра [21], [22]. Предполагается, что ламины образуют жесткие, но эластичные и сжимаемые сети, которые функционируют как «молекулярные амортизаторы» [23]. Механические свойства ядра сочетают упругость (эластичность) и вязкость (текучесть). Принятая на сегодня модель предполагает, что эластичность регулируют ламины как А-, так и В-типа, в то время как вязкость в основном контролируется А-ламинами [24]. При этом ламины А-типа являются основными детерминантами механических свойств ядра и его механической реакции на деформации [25], [26], [27]. Различия в уровне экспрессии ламина А коррелируют с жесткостью ткани: мышечные и костные ткани с более высокой экспрессией ламина А имеют более жесткие ядра, чем клетки жировой ткани и мозга [28], [29].

По-видимому, ламинам принадлежит важная роль в определении механических свойств и целой клетки [30]. Регуляция жесткости цитоплазмы, опосредованная цитоскелетом, в значительной степени зависит от структурной целостности ламиновой сети [17]. Нуклео- и цитоскелетные элементы клетки связаны между собой через белки LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)-комплекса – многокомпонентной структуры, которая пронизывает ЯО и взаимодействует с цитоскелетными филаментами с одной стороны и ламиной – с другой [31]. По-видимому, это взаимодействие определяет возможность движения и перемещения ядра в клетке. Нарушениями во взаимодействии нуклео- и цитоскелета можно объяснить то, что недостаток ламина А/С приводит к дефектам в клеточной поляризации, миграции, механотрансдукции [22], [32].

Недавние исследования ясно показывают, что ядро – «верховный» клеточный механосенсор, который играет решающую роль в восприятии клетками механических свойств окружающей среды и реакции на них [33], [34], [35]. Наиболее известный механизм механотрансмиссии от периферии клетки к ядру включает цитоскелет, комплексы LINC и белки, связанные с ЯО, в первую очередь ламины. Внешние механические нагрузки вызывают изменения в полимеризации ядерной ламины и состоянии конденсации хроматина, тем самым регулируя экспрессионный и трансляционный потенциал, эластичность и деформируемость ядер и, в итоге, реакцию клетки на механическое воздействие. Ламины способствуют ядерной механотрансдукции также через взаимодействие с ядерными поровыми комплексами (ЯПК). Они участвуют в закреплении и распределении ЯПК в ядерной оболочке [34], [36].

Находясь на нуклеоплазматической стороне внутренней ядерной мембраны, ламина непосредственно взаимодействует с хроматином и предоставляет сайты для закоривания хроматиновых доменов высшего порядка. С ламинной динамически взаимодействуют большие (0,1–1 Mb) домены хроматина, которые называются LAD (Lamina Associated Domains) [37], [38]. Хорошо известно, что они бедны генами и характеризуются низким уровнем транскрипционной активности [37], [39]. В соответствии с этим периферию ядра занимает преимущественно гетерохроматин (хроматин в компактном, конденсированном состоянии) [40], [41], [42], что схематично изображено на рисунке 3. Это указывает на транскрипционно-репрессивный характер взаимодействия с ламинной [37], [43].

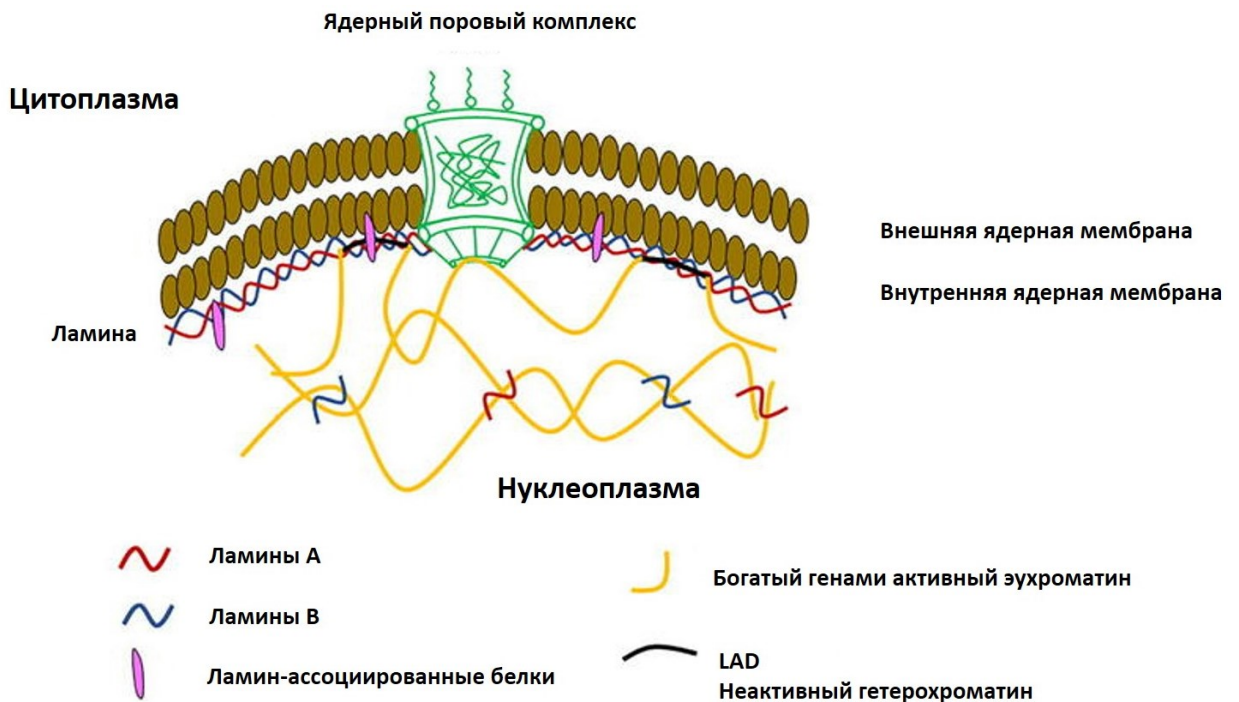


Рисунок 3. Организация ядерных ламин. Ядерная ламина представляет собой сетчатую структуру, образованную ламинами А- и В-типа и связанными с ними белками, прилегающими к внутренней ядерной мембране. Ламины А- и В-типа взаимодействуют с периферическими гетерохроматиновыми ламина-ассоциированными доменами (LAD) и регулируют их организацию посредством прямого взаимодействия либо косвенных механизмов, которые опосредуются ламин-ассоциированными белками. Ламины А- и В-типа дополнительно взаимодействуют с активными эухроматиновыми доменами в нуклеоплазме (адаптировано из [17]).

К настоящему времени накоплено большое количество данных о том, что ламина прямо вовлечена в репрессию генов [40], [44]. Экспериментальное закрепление генов на ламине вызывает ингибирование экспрессии некоторых (но не всех) эндогенных и репортерных генов [45], [46]. Ламины могут связываться как непосредственно с ДНК, в районах MAR/SAR (Matrix Attachment/Scaffold-Associated Regions) [47], [48], так и с гистонами [49], таким способом участвуя в регуляции экспрессии через модулирование эпигенетических механизмов [50], [51]. Гистоны могут быть эпигенетически модифицированы с помощью сайт-специфичных комбинаций фосфорилирования, ацетилирования и метилирования, которые коррелируют со специфическими биологическими последствиями, такими как активация или репрессия транскрипции, ремоделирование или стабилизация хроматина. В частности, ацетилирование гистонов H3 и H4 положительно коррелирует с активной транскрипцией генов. Подавляющее большинство генов, связанных с ламинной, транскрипционно неактивны и обогащены репрессивными эпигенетическими метками H3K27me3 and H3K9me2 [37], [41], [52]. Кроме того, есть данные, что ламина задействована в организации хромосомных территорий, причем на периферии ядра, как правило, позиционируются именно бедные генами хромосомы [53]. Однако молекулярный механизм, лежащий в основе регуляции экспрессии генов путем закоривания хроматина на ламине, остается непонятным.

Известно, что ламины (в большей степени А) способны связывать и эухроматин (менее конденсированный и транскрипционно-активный) [38], [54], [55], ограничивая подвижность хроматина внутри ядра [56]. Помимо пространственной организации хроматина внутри ядра, динамическая ассоциация нуклеоплазматического ламина А/С с эухроматиновыми регионами может выполнять более сложные функции в регуляции активности генов и клеточном сигналинге [57], [58]. Известно, что связывание ламина А/С с эухроматином опосредуется его партнером LAP2 α (Lamina-Associated Polypeptide 2 α) [55]. Есть экспериментальные доказательства того, что нуклеоплазматические комплексы ламин А/С-LAP2 α потенциально могут участвовать в регуляции прогрессии клеточного цикла, поскольку они связывают

основной регулятор клеточного цикла белок ретинобластомы (Rb) и регулируют его активность [59], [60].

Будучи задействованными в организации хроматина, ламины оказываются вовлечены во многие специализированные клеточные функции, которые требуют ремоделирования хроматина: транскрипция, репликация и репарация ДНК [20], [61], [62], [63]. В целом, ламины выступают как «хранители» генома, обеспечивая его стабильность через модуляцию механизмов репарации ДНК и поддержания гомеостаза теломер [64], [65], [66].

Структура и организация ядерной ламины естественным образом меняется в процессе клеточного деления [67]. В начале деления ядерная оболочка разрушается. На ранних стадиях митоза ламины оказываются распределены в цитоплазме в неполимеризованном состоянии. В конце митоза ламины участвуют в сборке ядерных оболочек дочерних клеток. Деполимеризация и сборка ламиновой сети регулируются фосфорилированием ламинов [38]. В то время как ламины В остаются связанными с остатками ядерной мембраны во время перехода от анафазы к телофазе, ламины А/С отделяются от ядерной мембраны и рассеиваются по всей митотической цитоплазме после фосфорилирования и деполимеризации. Включение ламинов А-типа в ядерную оболочку дочерних клеток происходит только после того, как собраны все ее основные компоненты, включая поровые комплексы. Молекулярные взаимодействия ламинов в процессе сборки ядерной оболочки еще предстоит детализировать.

Участие ламины в столь широком круге клеточных физиологических и регуляторных процессов обеспечивается в том числе через взаимодействие ламинов с ламин-ассоциированными белками. Одни из них выступают в качестве своего рода «архитектурных партнеров»: те, которые важны для структуры ламины и связывают ламины с ЯО, хроматином, субъядерными структурами (как, например, интегральные мембранные белки LAP, эмерин). Другие представляют собой белки функциональных комплексов, такие как транскрипционные активаторы и репрессоры [68]. С одной стороны, ламины могут ослаблять сигнальные пути, действуя как периферическая ядерная «ловушка» для регуляторов транскрипции. Это известно для c-Fos [69], транскрипционного активатора Notch-пути SKIP [70], SREBP1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1) – ТФ, вовлеченного в липидный метаболизм и адипоцитарную дифференцировку [71]. С другой стороны, ламина может служить платформой для сигнальных молекул, обеспечивая эффективные реакции.

Через множественные взаимодействия ламины вовлечены в регуляцию сигналинга и передачу сигналов, биохимических и механофизических (механотрансдукция), от внутри- и экстраклеточного окружения к генам-регуляторам. Механическая роль ламинов и их функции в регуляции экспрессии генов часто рассматриваются как независимые «виды деятельности», но все больше результатов исследований свидетельствует о том, что эти функции взаимосвязаны и

взаимозависимы, что особенно очевидно в отношении механосигналинга [72]. Механические сигналы приводят к изменениям в молекулярной структуре и модификации ламин и с их участием конвертируются в биохимические, вызывая генно-регуляторный ответ клетки.

Количество известных взаимодействий ламин с белками-партнерами быстро увеличивается, однако еще очень далеко до детального понимания того, как специфические взаимодействия ламин связаны с организацией хроматина и функционированием генома.

Таким образом, ядерная ламина регулирует структурную и функциональную целостность ядра, определяя и поддерживая его форму, а также обеспечивая закрепление, стабилизацию и пространственную организацию хроматина внутри ядра.

1.2 МУТАЦИИ ЛАМИНА А/С И ЛАМИНОПАТИИ

1.2.1 Мутации ламин А/С

В силу того, что ламин являются ключевыми структурными элементами ядра и задействованы в фундаментальных клеточных процессах, нарушение их функций в результате мутаций должно приводить к серьезным последствиям для клетки. Эмбрионы мыши, у которых отсутствуют ламин В-типа, имеют замедленные митозы и кумулятивные дефекты развития [73], [74]. Дефицит ламин А ведет к смерти в перинатальном периоде у человека и мыши вследствие дефектов сердечной и скелетной мускулатуры [75], [76], [77], [78].

Однако заболевания человека, ассоциированные с дефектами в генах ламин В-типа, до недавнего времени известны не были. Их отсутствие предполагает, что потеря одного из двух ламин В либо несущественна (вероятно, они имеют перекрывающиеся функции), либо приводит к смерти на ранних стадиях развития. Сейчас (во многом благодаря росту возможностей экзомного и геномного секвенирования) известны некоторые варианты генов *LMNB1* и *LMNB2*, связанные с неврологическими заболеваниями (лейкодистрофия [79], микроцефалия [80], эпилепсия [81], [82], [83]) и частичной липодистрофией [84]. В экспериментальных животных моделях мыши с гомозиготной инсерционной мутацией ламин В1, приводящей к синтезу этого белка без некоторых ключевых функциональных доменов, переживали период эмбрионального развития, но умирали при рождении с дефектами легких и костей [85]. *LMNB*-дефицитные мыши демонстрировали дефекты нейрональной миграции и серьезные аномалии развития мозга [86], [87]. В экспериментах *in vitro* в результате нокаута гена *LMNB1* малыми интерферирующими РНК (siRNAs) снижение экспрессии ламин В1 приводило к прекращению роста культивируемых клеток и апоптозу, тогда как снижение экспрессии ламин А-типа не оказывало заметного влияния на рост клеток [88].

В то же время ламины А-типа демонстрируют чрезвычайно широкий спектр мутаций и ассоциированных с ними клинических расстройств. Ген *LMNA* (lamin a/c, LMNA, OMIM: 150330) картирован в длинном плече 1 хромосомы (1q21.2-q21.3). Он имеет размер около 24 тысяч пар нуклеотидов и включает 12 экзонов [89]. В результате альтернативного сплайсинга первичного транскрипта в области 10 экзона образуются две различные мРНК, кодирующие соответственно преламин А и ламин С. Первые 566 аминокислот транслируемых с них белков идентичны. На С-конце ламин С содержит свою уникальную последовательность из 5 основных аминокислот, тогда как аминокислоты от 567 до 664 являются уникальными для ламин А и подвергаются поэтапному пост-трансляционному процессингу (фарнезилирование, протеолитическое расщепление, карбоксилирование), в результате которого образуется зрелый ламин А [63]. Этот процесс называется созреванием ламинов.

На сегодняшний день описано в общей сложности 498 мутаций ламин А/С (<http://www.umd.be/LMNA/>), ассоциированных с более чем 15 (называют число 17) гетерогенных клинических фенотипов [90]. Первое заболевание (аутосомно-доминантная мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (Emery–Dreifuss Muscular Dystrophy, EDMD)) было ассоциировано с мутацией в гене ламин А/С в 1999 году [91]. За прошедшее с этого события время количество описанных мутаций выросло лавинообразно. Сейчас это максимальное количество мутаций, известных для одного гена, и максимальное количество заболеваний, связанных с одним геном. Поэтому *LMNA* считается самым мутированным геном.

Заболевания, вызываемые мутациями в генах ламинов (и ассоциированных с ними белков, например, эмерина), называют ламинопатиями. Ассоциированные с ламин А ламинопатии клинически очень разнообразны. Они проявляются преимущественно в мезенхимальных тканях и делятся на две основные группы: те, которые воздействуют на определенные ткани изолированно либо те, которые затрагивают множественные системы тканей. В зависимости от типа пораженной ткани ламинопатии можно разделить на несколько категорий: липодистрофии, нейропатии, дермопатии, кардиомиопатии и мышечные дистрофии (таблица 1).

Таблица 1. Классификация ламинопатий по типу пораженной ткани (адаптировано из [92], [93])

Мышечные дистрофии. <i>Характеризуются мышечным истощением.</i>	
Мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса X-сцепленная	EDMD1, XL-EDMD OMIM* 31300
Мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса аутосомно-доминантная	EDMD2, AD-EDMD OMIM 181350
Мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса аутосомно-рецессивная	EDMD3, AR-EDMD OMIM 604929
Дилатационная кардиомиопатия с дефектами проводимости 1А	DCM-CD/CMD1A OMIM 115200
Поясно-конечностная мышечная дистрофия 1В	LGMD1B OMIM 159001
Конгенитальная мышечная дистрофия	LMNA-CMD OMIM 613205
Синдром “рука-сердце”, словенский тип	HHS OMIM 610140
Липодистрофии. <i>Характеризуются аномальным распределением жировой ткани, которое может быть ассоциировано с метаболическими расстройствами, такими как диабет и инсулин-резистентность.</i>	
Семейная частичная липодистрофия Даннигана	FPLD2 OMIM 151660
Приобретенная частичная липодистрофия (синдром Барракера-Саймонса)	APL OMIM 608709
Нейропатии. <i>Характеризуются поражением периферических нервов.</i>	
Болезнь Шарко-Мари-Тута 2 типа	CMT2B1 OMIM 605588
Аутосомно-доминантная лейкодистрофия у взрослых	ADLD OMIM 169500
Системные ламинопатии. <i>Характеризуются разнообразием сопутствующих симптомов, поражающих различные типы тканей, часто с признаками преждевременного старения.</i>	
Прогерия, или синдром Хатчинсона-Гилфорда	HGPS OMIM 176670
Атипичный синдром Вернера	AWS

	OMIM 277700
Рестриктивная дермопатия	RD OMIM 275210
Мандибулоакральная дисплазия тип А с липодистрофией	MADA OMIM 248370

*Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

EDMD2: autosomal dominant Emery-dreifuss muscular dystrophy; LGMD1B: limb-girdle muscular dystrophy type 1B; *LMNA*-CMD: *LMNA*-congenital muscular dystrophy; DHS: dropped head syndrome; DCM-CD/CMD1A: dilated cardiomyopathy with conduction defect 1A; HHS: heart-hand syndrome; FPLD2: familial partial lipodystrophy type 2; APL: acquired partial lipodystrophy; CMT2B1: Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B1; ADLD: leukodystrophy, demyelinating, adult-onset, autosomal dominant; HGPS: Hutchinson-Gilford progeria syndrome; AWS: atypical Werner syndrome; RD: restrictive dermopathy; MADA: mandibuloacral dysplasia with type A lipodystrophy.

В литературе также описываются клинические случаи, представляющие перекрывающийся континуум различных типов ламинопатий (поэтому и сложно назвать точное число ламинопатий, ассоциированных с ламинем А). Например, у пациентов с клиническими признаками липодистрофии также наблюдаются изменения сердца и скелетных мышц [94]; описан пациент с чертами миопатии и периферической нейропатии [95].

Наиболее драматический фенотип, вызываемый мутациями *LMNA*, – прогерия, или синдром преждевременного старения Хатчисона-Гилфорда. В этом случае мутация не меняет кодируемую аминокислоту, но активирует сайт сплайсинга, в результате чего из молекулы вырезается около 50 нуклеотидов около С-конца. Получающийся при этом белок называется прогерином. Он не способен нормально встраиваться в ядерную ламину; кроме того, нарушается его взаимодействие с другими белками. Присутствие в ядре дефектного ламина приводит ко множеству патологических изменений: в ядре резко снижается содержание ряда белков, ядерная оболочка сморщивается, нарушается процесс репарации ошибок при синтезе ДНК. В итоге клетки теряют способность делиться, погибшие клетки не замещаются новыми, процесс старения ускоряется.

В ламинопатиях представлен практически весь диапазон мутаций: миссенс- и нонсенс-мутации; инсерции/делеции в рамке и со сдвигом рамки считывания; (редко) большие экзонные делеции; мутации, вызывающие дефекты мРНК-сплайсинга и гаплонедостаточность ламинов А-типа. Среди них миссенс-мутации (точечные мутации, приводящие к аминокислотным заменам) безусловно, являются наиболее частым типом мутаций, наблюдаемых при ламинопатиях, включая ламинопатии скелетной мускулатуры [1], [96]. Диапазон тканей и

функций, на которые влияют мутации ламина А, действительно поражает. При этом неразгаданным феноменом остается отсутствие четкой корреляции между видом и положением мутации в гене и вызываемым ею клиническим фенотипом.

1.2.2 Механизмы развития ламинопатий

Каким образом мутации гена, экспрессирующегося практически во всех дифференцированных соматических клетках, приводят к возникновению столь разных фенотипов, к тому же тканеспецифичных? Получили ряд доказательств и стали традиционными две основные теории [97].

Структурная гипотеза, или гипотеза механического стресса, основную роль в патогенезе ламинопатий отводит структурным дефектам ламины, возникающим вследствие мутаций. Дезорганизация белковой сети нарушает стабильность ядерной оболочки, что в результате приводит к повышенной хрупкости клеточных ядер с мутантными ламинами и снижению их устойчивости к механическому стрессу. Очевидно, утрата полноценной структурной функции катастрофична в первую очередь для тканей, которые «по роду деятельности» постоянно подвергаются механическому стрессу, таких как сердечная и скелетная мускулатура [21], [30], [98], [99]. Неспособность справляться с физическим стрессом для мышечных клеток означает их неспособность в целом функционировать должным образом в окружающей ткани.

Регуляторная гипотеза, или гипотеза генной экспрессии, основывается на роли ламины в регуляции экспрессии на многих уровнях, предполагая, что мутации ламина изменяют нормальные профили экспрессии генов либо непосредственно, через взаимодействия с хроматином, либо косвенно, путем нарушения межбелковых взаимодействий с ТФ, компонентами клеточных сигнальных путей, комплексами-модификаторами хроматина [57], [100].

Очевидно, что эти теории не являются взаимоисключающими. Механические силы запускают быстрые изменения в состоянии ассоциированного с ламиной гетерохроматина и, как следствие, в глобальном паттерне экспрессии генов. Поскольку ламина – ключевой компонент системы механотрансдукции, связывающий внешние механические сигналы с хроматином, вероятно, что дефекты этого компонента могут приводить к изменениям в регуляции экспрессии [101]. Так, ядра фибробластов *LMNA*^{-/-}-мышей действительно отличаются дефектной ядерной механикой, демонстрируя повышенную деформацию и хрупкость при механическом напряжении [21]. Но при этом ослаблена и транскрипционная активация в ответ на механические стимулы, что сказывается на жизнеспособности этих клеток.

Ядерная ламина взаимодействует с более 100 цитозольных и внутриядерных/нуклеоплазматических белков [102]. Специфические мутации могут

индуцировать изменения во взаимодействии между ламинами либо их партнерами в ядерной оболочке и ключевыми факторами, вовлеченными в клеточные сигнальные пути и транскрипционную регуляцию. В зависимости от контекста, это может запускать различные патофизиологические механизмы, определяющие широкий спектр клинических фенотипов. Аномалии клеточного сигналинга (чаще всего гиперактивация) в присутствии мутаций ламина А многократно описаны у пациентов и животных моделей и подтверждены экспериментами *in vitro*. Это касается ERK1/2 и других MAP-киназ [103], [104], [105], [106], АКТ/mTORC1 [107], [108], TGF- β [109], BMP [110], YAP [111], [112], [113], основных апоптозных сигнальных путей [114], NF- κ B- и WNT-сигналинга [102], [115].

Проявление мутаций в столь широком спектре тканей теоретически можно объяснить существованием (большой частью пока не описанных) тканеспецифичных партнеров ламина А, взаимодействие с которыми нарушается в присутствии мутаций. Действительно, ламины и, к примеру, их партнеры – компоненты LINC-комплекса KASH-домен- и SUN-домен-содержащие белки – часто экспрессируются дифференциально [116], [117], [118]. Наиболее изученный случай тканеспецифичного партнерства ламина А касается фактора транскрипции SREBP1, который регулирует гены, необходимые для липогенеза *de novo*. Нарушение этих взаимодействий в результате мутаций служит причиной развития липодистрофий [119], [120]. Кроме этого, известно, что ламин А/С и эмерин (его белок-партнер, который задействован в ассоциации ламины с LAD-доменами) регулируют внутриклеточную локализацию (и тем самым транскрипционную активность) механочувствительного фактора транскрипции MKL-1, принадлежащего семейству миокардина – ключевого «мастера-регулятора» в развитии и функционировании сердечно-сосудистой системы [121]. Специфический партнер ламина А известен и в мышечной ткани. Этот белок (MLIP, Muscle-enriched A-type Lamin-Interacting Protein) колокализуется с ламинем А в ЯО, взаимодействует с областями генома в непосредственной близости от генов, контролирующих тканеспецифичную дифференцировку, и выступает в качестве транскрипционного регулятора миогенной программы в скелетно-мышечных клетках [122].

Чтобы определить взаимосвязь между мутациями и их клиническими проявлениями, был использован иерархический кластерный анализ [123]. Как было выяснено, ламинопатии, которые затрагивают поперечно-полосатую мускулатуру и периферические нервы, большей частью ассоциированы с мутациями, локализованными в мономере белка до сигнала ядерной локализации (в котором, к слову, к настоящему времени мутаций не выявлено). Регион молекулы ламина до NLS содержит центральный α -стержневой домен, который служит строительным блоком при полимеризации филаментов. Мутации в этом регионе ведут к структурным изменениям ламины, что может стать причиной хрупкости и изменений в

механочувствительности ядер. Это может объяснить столь широкое поражение механочувствительных тканей, таких как сердечная и скелетная мускулатура. Ламинопатии, которые представляют липодистрофийные и прогероидные синдромы, ассоциированы с мутациями, локализованными на С-конце молекулы после NLS. Этот регион содержит глобулярный хвостовой домен, который может взаимодействовать с ДНК, хроматином, ТФ. Согласно регуляторной гипотезе, мутации в этом регионе нарушают контакты между ядерной ламиной и хроматином/ТФ, что влияет на контроль генной экспрессионной программы и приводит к изменению клеточного фенотипа в патологическом направлении. В подтверждение этому предпринятое впоследствии другой группой исследование также с применением иерархического кластерного анализа показало, что мутации, расположенные до NLS, связаны с более неблагоприятным сердечным фенотипом [124]. Однако четких корреляций генотип/фенотип в отношении специфических субдоменов белка ламина А немного. Установление корреляций, безусловно, усложняется большой клинической вариабельностью и наличием перекрывающихся фенотипов. Интересно, что каждый из синдромов липодистрофии и преждевременного старения (мутации которых сгруппированы в N- и С-терминальных доменах), как правило, ассоциирован с hotspot-мутацией, на долю которой приходится около 80% пациентов. Кроме того, нонсенс-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания крайне редки в этих фенотипах и выявляются почти исключительно у пациентов со скелетно-мышечными ламинопатиями [1].

Вследствие множественности и разнообразия функций, приписываемых ламинам, патофизиологических моделей, описывающих возникновение и развитие ламинопатий, так же много. Так, в силу значимости ламинов для поддержания целостности ядра ожидаемым следствием действия мутаций являются изменения в глобальной архитектуре ядра [125]. Это выражается в изменениях во взаимодействии ламины с хроматином [126] и возникающей нестабильности генома, в частности, в изменении длины и структуры теломер [64], [127]. Среди факторов, вносящих вклад в возникновение и развитие патологии, называют нарушение тканевого гомеостаза и регенерации тканей из-за дефектов стволовых клеток [128], [129]; разрывы ядерной оболочки и повреждение ДНК [130], [131], [132]; утрату клеточной компартментализации вследствие повреждений ЯО [133]; дефекты ядерной и клеточной механочувствительности [72].

Очевидно, что ни одна из гипотез исчерпывающе не объясняет плеiotропного проявления мутаций гена *LMNA*. Скорее всего, в каждом случае имеет место комбинация эффектов, специфичных для конкретной мутации и измененного функционального отдела белка. Помимо типа/положения мутации, могут иметь значение модифицирующие факторы, в

результате действия которых при одной и той же мутации могут формироваться разные фенотипы.

1.2.3 Скелетно-мышечные ламинопатии

Превалирующая – около 80% – часть мутаций ламина A/C связана с заболеваниями поперечно-полосатой мускулатуры [1]. Некоторые из этих ламинопатий затрагивают исключительно мышечные ткани, в части вариантов кардио- и скелетно-мышечные нарушения сочетаются с поражением других тканей.

Выделяют три основных миопатических фенотипа, ассоциированных с мутациями ламина A/C, на основании распределения поражений мышц и возраста дебюта заболевания: EDMD (мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса), LGMD1B (поясно-конечностная мышечная дистрофия, тип 1B) и *LMNA*-CMD (конгенитальная мышечная дистрофия, *LMNA*-ассоциированная) (таблица 2). Однако эти три клинических фенотипа могут вызываться одними и теми же мутациями и сосуществовать как варианты внутрисемейного полиморфизма. Таким образом, их можно рассматривать как функциональный континуум в клиническом спектре *LMNA*-связанных миопатий.

Как все мышечные дистрофии, *LMNA*-ассоциированные миопатии отличаются прогрессирующей слабостью и атрофией мышц. Все три характеризуются угрожающим жизни вовлечением сердца в виде дилатационной кардиомиопатии с дефектами проводимости [134]. Это редкие болезни, чрезвычайно вариабельные по тяжести. Наиболее тяжелой формой является *LMNA*-ассоциированная конгенитальная мышечная дистрофия.

Таблица 2. Клиническая и генетическая характеристика пациентов со скелетно-мышечными ламинопатиями (адаптировано из [135])

	EDMD2	LGMD1B	LMNA-CMD
Время дебюта	2-3 декада	3-4 декада	<2 лет
Распределение мышечной слабости	мышцы плечевого, лопаточного пояса и перонеальной группы	мышцы лопаточного и тазового пояса	диффузное или аксиальное (DHS, синдром опущенной головы)
Контрактуры сухожилий	часто; специфичны локтевые контрактуры	достаточно часто	часто; позвоночник, бедра, колени, ахилловы сухожилия
Поражение сердца	не меняется с возрастом; возникает после скелетно-мышечного фенотипа; ДКМ +/- дефекты проводимости	не меняется с возрастом	часто; дефекты проводимости
Поражение органов дыхания	редко	редко	очень часто
Потеря самостоятельного передвижения	редко	редко	очень часто
Тип наиболее часто встречающихся мутаций	миссенс	сдвиг рамки считывания	миссенс

ДКМ: дилатационная кардиомиопатия; EDMD2: autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy – аутосомно-доминантная мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса; LGMD1B: limb-girdle muscular dystrophy type 1B –поясно-конечностная мышечная дистрофия тип 1B; LMNA-CMD: LMNA-congenital muscular dystrophy, LMNA-ассоциированная; DHS: dropped head syndrome – синдром опущенной головы.

В чем же причина «пристрастия» мутаций ламина А к мышечной ткани?

Очевидно, одно из объяснений этому находится в плоскости механобиологии и касается нарушения ядерного механического гомеостаза. Ламины – основные детерминанты механических свойств ядра, и центральная роль ядерной ламины отражает ее способность "устанавливать" ядерную жесткость на основании свойств внешнего механического окружения

и модулировать ее в ответ на возмущения при механической нагрузке. Таким образом, мышечно-специфические дефекты ламинопатий во многом связаны со снижением способности ткани противостоять механическим нагрузкам – силам растяжения и сжатия при мышечном сокращении – на уровне ядра [136].

В соответствии с этой моделью мутации, ответственные за мышечные фенотипы, имеют более серьезное воздействие на ядерную механику, чем мутации, связанные с другими ламинопатиями. Клетки, содержащие миопатические, но не липодистрофийные мутации ламина в культуре и в интактной мышечной ткани демонстрируют нарушение ядерной стабильности: повышенную деформируемость, неспособность восстанавливать жесткость ядра, дефектную передачу механических сил [137]. Во многих случаях миопатических мутаций экспрессирующиеся мутантные белки имеют aberrantную нуклеоплазматическую локализацию [137], [16], [7]. Очевидно, большая часть этих мутантных белков в силу структурных изменений остается растворимой и не встраивается в ядерную ламину, вследствие чего ламина не может адекватно поддерживать стабильную архитектуру ядра. В одном из последних исследований применили функциональный геномный подход для оценки функциональных свойств большого количества (178) миссенс-вариантов *LMNA* в пяти структурных доменах белка. Оно убедительно показало, что aberrantная агрегация и мисфолдинг мутантных ламинов – основная детерминанта именно кардио- и скелетно-мышечных ламинопатий [138]. Образование неправильно свернутых агрегатов ламина А очевидно несет угрозу ядерной стабильности.

Снижение ядерной стабильности, в частности повышенная деформируемость ядер, отличает именно *LMNA*-ассоциированные миопатии и нехарактерно для мышечных дистрофий в целом [132]. Но не все миопатические мутации ламина приводят к серьезным дефектам ядерной стабильности. В упомянутой выше работе [137] было показано, что мутации, которые не изменяют стабильность ядра (в их присутствии мутантные ламины, предположительно, корректно встраиваются в ламину и поддерживают нормальную жесткость ядра), тем не менее, влияют на внутриклеточную передачу механических сил. Интересно, что это касалось и протестированных *FPLD*-мутаций, что в некоторой степени объясняет факт поражения мышечной ткани при липодистрофийных синдромах. Ядерная трансдукция определяет биологический ответ на внешние механические воздействия, поэтому именно от нее зависит мышечная пластичность – уникальное свойство скелетных мышц адаптироваться в ответ на механические требования. Закономерно, что нарушение этого процесса приводит к патологическим сдвигам в нормальном физиологическом функционировании мускулатуры.

Поскольку для механотрансдукции решающее значение имеет физическая связь между цитоскелетом и ядерной ламинной [139], то вероятно, что в последних описанных случаях, где нарушена внутриклеточная механическая передача, имеет место дисфункциональность

нуклео/цитоскелетной связи. По-видимому, нарушение взаимодействия между ядром и цитоскелетом – еще одна из критических причин фенотипического проявления мутаций ламина А в мышечной ткани. Утрата функциональной связи нуклео- и цитоскелета влияет не только на передачу механических воздействий к ядру, но и модулирует механореакцию, ответ «изнутри-наружу», а именно нарушает цитоскелетную динамику и организацию, что может быть критичным именно для мышечных клеток с их уникальной цитоскелетной архитектурой [33], [140], [141]. Так, мутации ламина А-типа снижают способность миобластов адаптировать свой актиновый цитоскелет к жесткости субстрата и противостоять механическому растяжению внеклеточного матрикса вследствие дерегуляции сигнального пути YAP, важного регулятора механореспонсивности [111]. Потеря взаимодействия поврежденного ядра с окружающим цитоскелетом для всей клетки имеет генерализованные последствия в виде клеточной «слабости» – уменьшения эластичности и механической жесткости цитоплазмы и неспособности клетки настраивать внутреннюю жесткость в соответствии с микроокружением [30]. В этой связи представляется интересным наблюдение, что в мышечных волокнах (МВ) *LMNA*^{-/-}-мышей дизорганизованные саркомеры часто находятся в непосредственной близости от наиболее «пострадавших» ядер [3]. Утрата целостности общей структурной клеточной сети вследствие дисфункциональности ламина подтверждается протеомными исследованиями. Так, у носителей 12 мутаций *LMNA*, разбросанных по всей длине белковой молекулы, были выявлены дифференциальные изменения экспрессии цитоскелетных и связанных с ними белков [12]. Аналогичным образом в клетках HeLa подавление экспрессии ламина А/С РНК-интерференцией имело результатом общее снижение экспрессии цитоскелетных белков [9].

Нуклео/цитоскелетное взаимовлияние механически опосредуется связанностью ламинов с комплексами LINC, которые объединяют взаимодействующие между собой в перинуклеарном пространстве KASH-доменные белки (в частности, гигантские белки несприны) во внешней ядерной мембране и белки с SUN-доменом, встроенные во внутреннюю ядерную мембрану. На цитоплазматической стороне несприны контактируют с цитоскелетными элементами (перинуклеарным актином, микротрубочками, основным цитоскелетным белком ПФ в мышечных клетках десмином); на нуклеоплазматической SUN-белки взаимодействуют с ламиной и ЯПК (рисунок 4) [142]. Про SUN1 известно, что его закрепление в ядерной мембране зависит от ламина А [143].

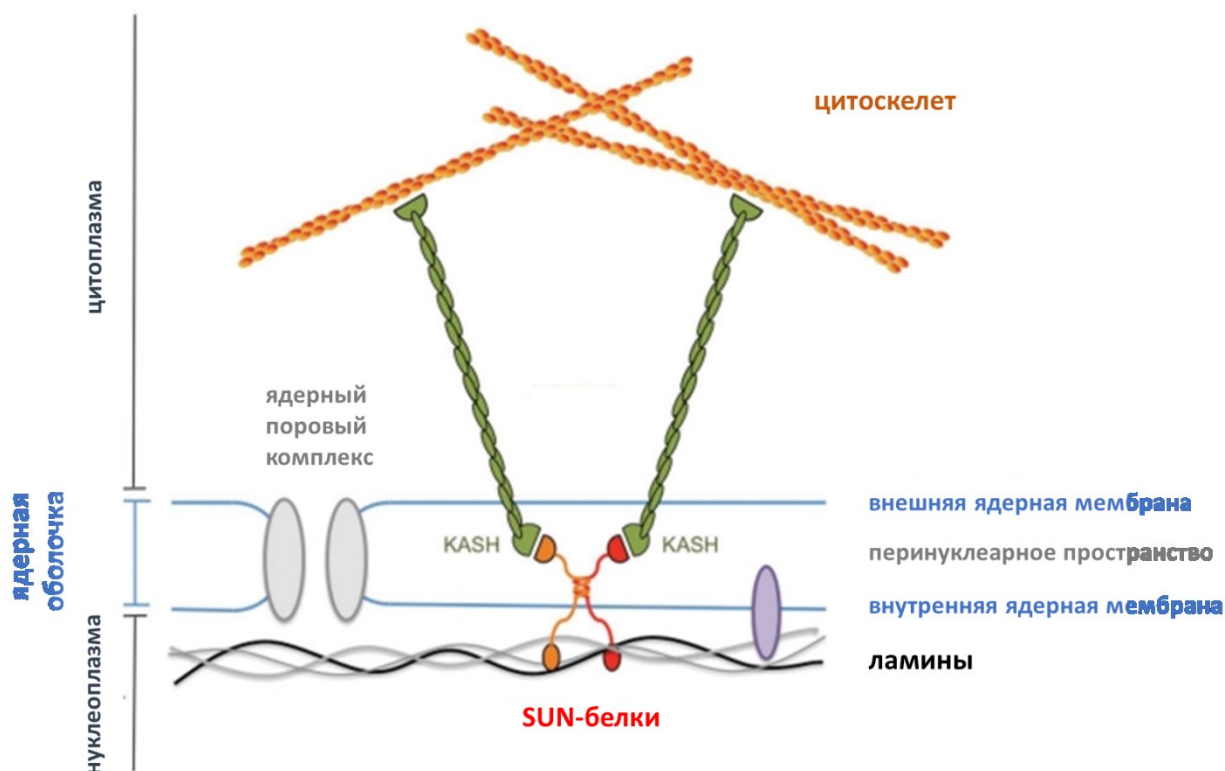


Рисунок 4. Прототипный LINC-комплекс (Linker of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton). LINC-комплекс содержит трансмембранные SUN-доменные белки во внутренней ядерной мембране и KASH-доменные белки во внешней ядерной мембране, которые физически взаимодействуют друг с другом в перинуклеарном пространстве. На нуклеоплазматической стороне SUN-доменные белки (красный и оранжевый) взаимодействуют с ламинной (черный и серый) и с белками, ассоциированными с внутренней ядерной мембраной, такими как эмерин (фиолетовый). На цитоплазматической стороне KASH-доменные белки (зеленый) контактируют с компонентами цитоскелета. Таким образом LINC-комплексы обеспечивают физическую связь между ламинной и цитоскелетом (адаптировано из [144]).

Есть много подтверждений тому, что целостность связи ядро-цитоскелет особенно важна для функционирования скелетной мускулатуры [21], [139], [142], [145]. Разрушение LINC-комплексов ингибирует миогенную дифференцировку *in vitro* [139]. Мутации в генах, кодирующих несприны 1 и 2 [146], [147], [148] и белки SUN [149], [150], также вызывают мышечные дистрофии, подобно мутациям *LMNA*. Про некоторые EDMD-ассоциированные мутации ламина А известно, что они нарушают именно взаимодействие с SUN1 и SUN2 [151]. Тот факт, что все эти белки (несприны/SUN/ламины) взаимодействуют друг с другом, свидетельствует в пользу общего механизма заболевания, который, вероятно, связан с дисфункциональностью связи нуклео- и цитоскелета. В исследовании связи ламина А с несприном-2 обнаружился интересный факт: разные мутации ламина влияли на это взаимодействие в разной степени, в спектре от усиления до ослабления [152]. Этот небольшой

факт, возможно, слегка рассеивает туман над загадкой множественности проявлений мутаций ламина А.

Связь нуклео- и цитоскелета играет неоспоримо важную роль в закреплении и позиционировании миоядер. Внутреннее пространство мышечной клетки высокоструктурировано, и ядра в нем позиционируются точно [153]. Скелетно-мышечные волокна содержат сотни уплощенных миоядер, равномерно распределенных по периферии каждой клетки, с 3-8 синаптическими ядрами, закрепленными под нервно-мышечным соединением. В то же время цитоплазма мышечного волокна почти полностью занята миофибриллами – органеллами, состоящими из саркомеров и обеспечивающими сокращение мышечных клеток. Саркомеры образованы белковыми филаментами: тонкими актиновыми и толстыми миозиновыми. Концы актиновых филаментов крепятся к белкам Z-дисков на границах саркомеров.

Расположение ядер на периферии мышечных волокон является отличительной чертой скелетно-мышечной ткани, хотя функциональный смысл этой структурной характеристики (кроме кажущейся очевидной максимизации сокращений) остается расплывчатым. Точное позиционирование и закрепление ядер важно для их правильного распределения вдоль длины мышечной клетки и в нервно-мышечных соединениях, а также для их движения при сокращении МВ. Неправильное расположение ядер способствует мышечной дисфункции [154], [155]. Каким образом ядра упорядоченно распределяются внутри мышечного волокна, пока малопонятно, особенно в ткани. Ясно только, что позиционирование ядер является активным процессом, который происходит во время дифференцировки и созревания МВ, а также при регенерации скелетной мускулатуры.

Доказано, что LINC-комплексы жизненно важны для позиционирования и перемещения миоядер в скелетно-мышечных клетках [154], [156], [157], [158], [159] и дефекты этого процесса связаны с нарушением функционирования мускулатуры [150], [155], [160], [161]. Позиционирование ядер предшествует формированию саркомеров, и связь ядра с цитоплазмой через LINC-комплексы имеет решающее значение для правильной сборки и стабильности саркомерной сети [162]. Взаимодействие между ламинем А и LINC способствует ядерному позиционированию в МВ и может быть вовлечено в патогенетические механизмы [163].

Множественные комплексы LINC собираются в трансмембранные ядерные линии, ассоциированные с актином (TAN, Transmembrane Actin-associated Nuclear), которые прикрепляют ядра к актиновым нитям во время движения ядра. А-Ламины требуются для закрепления линий TAN таким образом, чтобы движение актиновых «тросов» приводило к движению ядра. Исследование 16 патогенных вариантов гена *LMNA* показало, что только те из них, которые вызывают мышечные заболевания, влияют на движение и позиционирование ядер

[164]. Очевидно, нарушение в распределении ядер аномально критично для такой структурированной ткани, как поперечно-полосатая мускулатура, и этот результат действия мутаций ламина А служит их проявлению именно в мышцах.

Исследования, проведенные на нескольких мышечных моделях мышечных ламинопатий, представляющих спектр разных по тяжести заболеваний, выявили корреляцию между степенью выраженности дефектов ЯО *in vitro* и тяжестью заболеваний *in vivo* [132]. Ядра первичных миобластов модельных животных демонстрировали нормальную морфологию, но при дифференцировке в зрелые сократительные миотрубки при трехмерном культивировании в них появлялись выраженные протрузии хроматина. Этот структурный дефект оказался присущ самим мутантным миоядрам и не был вызван изменениями в цитоплазматической передаче сигналов или архитектуре мышечных волокон. Кроме того, ядра в мутантных волокнах отличались масштабными транзиторными разрывами ЯО и повреждениями ДНК, а накопление повреждений ДНК коррелировало с гибелью МВ.

Что интересно, непосредственный механизм, приводящий к дефектам ЯО и повреждениям ДНК, оказался связан с мионуклеарной миграцией вдоль МВ во время дифференцировки. Движение ядер в процессе миогенеза зависит от микротрубочек. Центр организации микротрубочек, обычно находящийся в центросоме, в миоблестах локализован на ЯО [165], и микротрубочки в формирующихся миотрубках образуют собственные «клетки» вокруг миоядер. В нуклеации микротрубочек от ЯО участвуют несприны, и этот процесс необходим для корректного позиционирования и распределения миоядер в скелетно-мышечных клетках [166]. Ограничение движения ядер путем разрушения LINC-комплексов либо подавления активности микротрубочек элиминировало разрывы ЯО, уменьшало масштабы повреждений ДНК и имело благоприятный эффект на жизнеспособность МВ. Таким образом, одна из возможных моделей для объяснения специфичных для мышц дефектов при ламинопатиях привлекает действие цитоскелетных сил на механически ослабленные в результате мутаций ламинов миоядра, которое служит пусковым механизмом для возникновения разрывов ЯО и повреждения ДНК и в конце концов приводит к дисфункции и гибели мышечных волокон. Повреждения ДНК обнаружены и в биопсиях пациентов со скелетно-мышечными ламинопатиями, и их масштаб также коррелирует с тяжестью заболевания [132]. Этот вероятный механизм может дополняться другими, специфичными для конкретных мутаций. Таким образом, молекулярная механика скелетно-мышечной клетки контролирует целостность генома, и в норме ламина выполняет в отношении генома механопротекторную функцию. Как видим, эта экспериментально подтвержденная модель доказательно иллюстрирует теорию механического стресса.

Гипотеза генной экспрессии также находит подтверждение при объяснении проявления мутаций *LMNA* в мышечной ткани. Это, например, пертурбации экспрессионных профилей в терминально дифференцированных мышечных клетках [167]. Пертурбации касаются и микроРНК-транскриптомов, что было обнаружено у пациентов с *LMNA*-ассоциированными мышечными дистрофиями [168]. Среди микроРНК, чья экспрессия изменилась в дистрофийной ткани, оказались несколько из тех, которые участвуют в процессах пролиферации и дифференцировки мышечных клеток.

Таким образом, действие мутаций ламина А в мышечной ткани основано на комбинациях специфических механизмов, нарушающих структурную и функциональную архитектуру ядра и субклеточные процессы, которые связаны с уникальной инфраструктурой мышечной клетки, содержащей высокоорганизованный и упорядоченный цитоскелет.

1.2.4 Участие ламины в скелетно-мышечной дифференцировке

Как известно, экспрессия ламинов А-типа начинается во время эмбрионального развития, находится под тканеспецифичным контролем и продолжается в большинстве дифференцированных клеток взрослого организма [169]. Полагают, что их экспрессия важна для терминальной дифференцировки и поддержания дифференцированного состояния клетки. Это подтверждается тем, что гаплонедостаточность ламина А/С влияет на дифференцировочный потенциал эмбриональных стволовых клеток в направлении широкого ряда клеточных линий [170]. Это означает, что относительный уровень экспрессии ламина А/С является одним из важнейших факторов, определяющих комплексную программу тканеспецифической дифференцировки.

На более тонком уровне, каждый этап дифференцировки включает высокосоординированную реорганизацию взаимодействий ядерной ламины с хроматином, которые распространяются на сотни генов. Эти взаимодействия связаны с репрессией генов, и их реорганизация во время дифференцировки касается многих генов, которые важны для клеточной идентичности. У млекопитающих переход от недифференцированного либо плюрипотентного состояния к более дифференцированному сопровождается увеличением плотности упаковки периферического хроматина [171]. Таким образом, структурная репрессия определенных областей генома через его взаимодействие с ядерной ламиной необходима в контроле тканеспецифичных экспрессионных программ и отражает изменения в клеточной идентичности [172]. Изменения во взаимодействиях ламина А/С с хроматином при коммитировании и дифференцировке специфических клеточных линий сопровождаются изменениями в модификациях гистонов, как в масштабе хроматиновых доменов высшего

порядка, так и в регуляторных областях генов – субпромоторных регионах и хроматиновом окружении промоторов.

В эмбриональном развитии источник скелетной мышечной ткани – миобласты, клетки миотомов мезодермы, которые выселяются в определенные участки мезенхимы. Миобласты – высокопролиферативные клетки, но в начале дифференцировки они выходят из клеточного цикла и становятся миоцитами – специализированными клетками, обладающими потенциалом к слиянию друг с другом. Когда миоциты сливаются, они формируют мультинуклеарный синцитий – миотрубки. По мере созревания миотрубок и их перестройке в мышечные волокна настраивается иннервация и формируются сократительные единицы – саркомеры. Зрелое мышечное волокно содержит высокоорганизованный цитоскелет из упорядоченных миофибрилл, составляемых саркомерами. Полностью развитая мышца состоит из ассоциации мышечных волокон. Каждое мышечное волокно – продукт слияния сотен-тысяч моноклеарных миобластов. В распознавании, адгезии и клеточной сигнализации при слиянии миобластов задействованы многочисленные белки и регуляторные пути [173]. Мышечно-специфическими «фьюзогенами», контролирующими этот процесс, являются трансмембранные белки *Myomaker* и *Myomixer* [174].

При формировании миотрубки часть миобластов не участвует в слиянии. Это резидентные стволовые клетки – миосателлиты, они прилежат к МВ и регулируют мышечный гомеостаз, процессы регенерации и постнатального роста мышц. Широкий спектр сигнальных молекул управляет миогенезом во время эмбрионального развития и в постнатальном периоде [175], [176].

Миогенез (как эмбриональный, так и постнатальный) регулируется семейством миогенных регуляторных факторов транскрипции (MRF, Myogenic Regulatory Factors), чья деятельность в целом представляет парадигму, в которой ряд молекулярных переключателей запускает ступенчатый транскрипционный каскад и определяет судьбу всей клеточной линии [177], [178]. Это группа из четырех специфичных для мышц ТФ семейства *helix-loop-helix*: *MyoD*, *MRF-4*, *Myf-5* и миогенин [179]. Их кооперативное действие в нескольких ключевых точках спецификации мышечной линии приводит к установлению скелетно-мышечного фенотипа посредством регуляции пролиферации, необратимой остановки клеточного цикла клеток-предшественников с последующей координированной активацией саркомерных и других мышечно-специфичных генов для слияния миоцитов, сборки саркомеров и терминальной миогенной дифференцировки [177]. Еще 30 лет назад было показано, что сверхэкспрессия MRF в неммышечных клетках активирует миогенную конверсию, с подавлением других специфических вариантов клеточных программ и образованием дифференцированных мышечных клеток [180]. Они экспрессируются раньше, чем структурные белки, такие как

десмин и актин, и экспрессия этих белков в процессе развития находится под строгим пространственно-временным контролем. MyoD и Myf5 считаются факторами миогенной детерминации, тогда как миогенин включается позднее (причем его экспрессия запускается тремя другими MRF) и традиционно расценивается как дифференцирующий фактор, контролирующей терминальную дифференцировку миобластов в МВ. MRF-4 проявляет обе эти активности [181]. Среди них MyoD называют «мастером-регулятором» скелетно-мышечной программы.

Активность MRF тесно связана с контролем регуляции клеточного цикла. Для индукции миогенной дифференцировки критичен своевременный необратимый выход миобластов из клеточного цикла. Пролиферирующие миобласты экспрессируют MyoD и Myf5. На ранней стадии MyoD активирует экспрессию регуляторов клеточного цикла p21, циклина D3 и Rb [182]. Регуляторы клеточного цикла требуются для перехода в постмитотическое состояние, которое является необходимым условием для дифференцировки и включает p21-опосредованное дефосфорилирование Rb [182], [183]. Rb – транскрипционный репрессор, который при гипофосфорилировании (активации) подавляет E2F-зависимую транскрипцию генов-мишеней, участвующих в прогрессии клеточного цикла, что позволяет клеткам выходить из клеточного цикла и дифференцироваться. Rb критически важен для перехода от пролиферации к дифференцировке во время миогенеза [184]. Имеются обширные доказательства взаимовлияния Rb и MyoD, а также структурной и функциональной связи Rb и ламина А/С. Хотя механизм до конца не изучен, считается, что Rb усиливает активность MyoD во время мышечной дифференцировки [183], [185], участвуя в регулируемой MyoD экспрессии поздних генов в миотрубках посредством контролируемого взаимодействия с гистондеацетилазой HDAC1 [186]. Гипофосфорилированный Rb способен прямо связывать ламин А [187], [188]. Как мы уже говорили, ламин А участвует в регуляции Rb/E2F-сигналинга и в составе своего комплекса с LAP2α [59], [60]. Ламины А имеют отношение к субъядерной локализации белка ретинобластомы и предотвращают его протеосомную деградацию [189]. Индуцированный интерферирующими РНК нокдаун ламинов выявил, что ламины А и С не имеют существенного значения для клеточной пролиферации [88], но при этом являются решающими игроками при выходе из клеточного цикла [2]. Тем самым ламины в тканеспецифичных прогениторных клетках участвуют в детерминации клеточной судьбы, удерживая хорошо сбалансированное состояние между их пролиферацией и дифференцировкой [190].

Комплексное исследование транскриптомов (включающее очень обширный – на тот момент самый большой – объем данных относительно экспрессионных профилей в генетических болезнях человека) мышечных биопсий пациентов с EDMD, имеющими мутации

ламина А и эмерина, показало, что профили мРНК в мышечной ткани при этих заболеваниях схожи [167]. На основе этого анализа авторы выдвинули модель, предполагающую, что нарушение взаимодействия между ЯО, Rb и MyoD в точке выхода миобластов из клеточного цикла влияет на миогенные транскрипционные пути и приводит к дестабилизации транскриптома в дифференцированных клетках.

Таким образом, ламина представляет собой функциональный каркас, координирующий связь между регуляторами клеточного цикла и мышечно-специфичной дифференцировки.

Направляющая и решающая роль ламина А в скелетно-мышечной дифференцировке представляется неоспоримой. Миобласты мышечной $LMNA^{-/-}$ и даже $LMNA^{+/-}$ демонстрируют резко сниженный дифференцировочный потенциал, в частности, замедленную кинетику дифференцировки и измененную экспрессию MyoD, а также миогенных структурных и сигнальных белков [2]. Транскрипционная активность миоядер в МВ $LMNA^{-/-}$ -мышечной раскоординирована, и в них наблюдается перераспределение гетерохроматина с периферии ядра в нуклеоплазму [3]. У мышечной с таким генотипом МВ меньше по размеру и содержат меньше миоядер. В ядрах нарушена локализация MyoD и миогенина, и в МВ снижено содержание разных форм миозинов (сократительных белков миофибрилл) и тропонина Т (регуляторного белка сократительного аппарата). Миобласты $LMNA^{-/-}$, полученные из сателлитных клеток *ex vivo*, демонстрируют сниженную скорость пролиферации и задержку индукции дифференцировки и, в подтверждение этому, свидетельства активации LAP2 α /Rb- и TGF β 1-путей [4]. Как известно, TGF β 1 подавляет экспрессию генов, специфичных для скелетных мышц, и снижает активность MRF и специфичного для миоцитов энхансер-связывающего белка MEF [191].

Аномалии мышечной дифференцировки демонстрируют клетки, экспрессирующие мутантные ламины, *in vitro*. Так, сверхэкспрессия ламин с EDMD-ассоциированными мутациями R453W [5], [6] и W520S [7] ингибирует дифференцировку миобластов C2C12. Причем в обоих случаях подавляется экспрессия миогенина и наблюдаются аномалии, связанные с регуляцией выхода миобластов из клеточного цикла.

Есть прямое доказательство связи ламин А/С с промоторами мышечно-специфичных генов, полученное методом иммунопреципитации хроматина с последующим количественным ПЦР-анализом. Ламин А/С связывается с промоторами генов мышечной креатинкиназы, миогенина и MyoD в миобластах, но не в фибробластах. При дифференцировке ламин диссоциирует от этих промоторов, что коррелирует с появлением в промоторных областях мышечно-специфичных генов активных гистоновых меток [192]. Экспрессия R453W-мутантного ламина А мешает активации гена миогенина за счет поддержания репрессивного состояния хроматина в его промоторной области при индукции дифференцировки миобластов и

в целом изменяет ядерное распределение гистоновых меток – маркеров неактивного гетерохроматина [6]. Что показательно, эти эффекты отличаются при эктопической экспрессии липодистрофийной мутации R482W. Таким образом, как гено-специфичные, так и общегеномные эпигенетические перестройки хроматина, специфичные для каждой мутации, могут составлять молекулярную основу ламинопатий и их проявления в определенных тканях.

1.3 МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЛАМИНОПАТИЯХ

1.3.1 Роль митохондриальной биоэнергетики в функционировании скелетной мускулатуры

Скелетная мускулатура составляет до 40-50% общей массы тела человека со здоровым весом. Вместе с сердцем на скелетные мышцы приходится приблизительно 30% потребления энергии в состоянии покоя и почти 100% увеличенного потребления энергии во время физической нагрузки [193]. Это один из наиболее метаболически активных типов тканей, чрезвычайно зависимый от энергетического обеспечения, необходимого, чтобы производить сокращения.

Генерация и использование энергии в мышечных клетках основаны на множестве сложных метаболических процессов. Универсальное энергетическое «горючее» в мышцах - фосфатный компаунд аденозин-5'-трифосфат (АТФ). Основным источником, ответственным за производство АТФ, является система окислительного фосфорилирования (OXPHOS), которая состоит из пяти мультиолигомерных комплексов (I-IV и комплекса V, АТФ-синтазы), а также переносчиков электронов убихинона и цитохрома С электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) во внутренних мембранах митохондрий. Респираторные комплексы переносят электроны к кислороду как конечному акцептору. Энергия, высвобождаемая в этом процессе, запасается в форме протонного градиента, который создает электрический потенциал на внутренней митохондриальной мембране. Энергия электрохимического градиента используется для производства АТФ. Окислительное фосфорилирование «заправляется» циклом Кребса в матриксе митохондрий, за счет гликолиза и β -окисления жирных кислот в присутствии достаточного количества кислорода. Глюкоза и жирные кислоты поступают по кровеносным сосудам, а также в значительных количествах накапливаются в мышечных волокнах в виде гликогена и внутриклеточных липидов (состоящих главным образом из триглицеридов), соответственно.

Клетки скелетных мышц сокращаются, когда это необходимо, и эта ткань уникальна тем, что она может изменять скорость своего метаболизма в зависимости от предъявляемых к ней

требований. Потребности в энергии во время сокращения скелетных мышц мгновенно увеличиваются вплоть до 100-кратного потребления АТФ [194], [195]. Когда потребности в энергии превышают способность скелетных мышц обеспечивать АТФ в окислительных условиях, стимулируется гликолиз, приводящий к анаэробному образованию АТФ.

Таким образом, основными регуляторами клеточного метаболизма и энергии через АТФ являются митохондрии. Эти органеллы жизненно важны для поддержания энергетического гомеостаза в мышечных клетках, основанного на высоких биоэнергетических требованиях ткани. Митохондрии также являются основным источником активных форм кислорода (АФК) – существенно важных вторичных мессенджеров (перепроизводство которых, однако, может привести к окислительному стрессу). Кроме того, митохондрии вовлечены в огромное множество биосинтетических путей, служат местом поглощения кальция (что особенно важно в возбудимых клетках, как скелетно-мышечные), участвуют в поддержании липидного гомеостаза и являются важными компонентами нескольких клеточных сигнальных путей. Так, им присвоена центральная роль в регулировании апоптотической гибели клеток посредством образования пор, изменяющих проницаемость митохондрий (МРТР, Mitochondrial Permeability Transition Pore) [196].

Митохондрии стратегически распределены в клетке, и их биоэнергетическая функция высокочувствительна от их ультраструктуры и морфологии [197], [198]. Эти органеллы не являются дискретными или автономными, а образуют высокодинамичные взаимосвязанные сети, на биогенез и структуру которых в значительной степени влияют потребности клетки. Повышенный энергетический спрос удовлетворяется за счет митохондриального биогенеза и слияния отдельных митохондрий в динамические сети, в то время как снижение спроса приводит к удалению избыточных митохондрий путем их фрагментирования и митофагии [199]. Оптимальная приспособляемость к потребностям клетки обеспечивается за счет эффективной связи между ядерным и митохондриальным геномами.

Митохондриальная функция и активность меняются при дифференцировке клеток, что было показано для многих клеточных типов, включая миообласты [200], [201], [202]. При их дифференцировке в миотрубки резко возрастает энзиматическая активность митохондрий [203], [204]. Во время миогенеза увеличиваются масса/объем митохондрий, количество копий митохондриальной ДНК (мтДНК) и происходит метаболический сдвиг от гликолиза к окислительному фосфорилированию в качестве основного источника энергии [205]. Мышечные волокна различаются содержанием митохондрий: медленные МВ (окислительные, тип I) содержат много митохондрий, быстрые (тип II) – меньшее их количество.

Таким образом, митохондрии являются уникальными жизненно важными органеллами в контроле энергетического метаболизма и контрактильной функции скелетной мускулатуры.

1.3.2 Митохондриальная дисфункция в скелетной мускулатуре при генетически детерминированных нервно-мышечных заболеваниях (по [8])

Итак, энергетический обмен в скелетной мускулатуре строго контролируется для оптимального удовлетворения энергетических потребностей, что делает эту ткань особенно восприимчивой к дефектам митохондриальной функции. Изменения в содержании, распределении, морфологии и физиологии митохондрий указывают на их дисфункциональность, которая влияет на способность мышечных клеток быстро адаптировать биоэнергетические механизмы для удовлетворения энергетических потребностей ткани.

На текущем этапе исследований благодаря накапливающимся данным становится все более очевидным, что, независимо от первоначальной причины, митохондриальная дисфункция является общей чертой генетически обусловленных заболеваний скелетной мускулатуры. Ее проявления сходны при различных расстройствах. О нарушении митохондриальной функции может свидетельствовать аномальное накопление миофибриллярных липидов (поскольку это указывает на подавление митохондриального и клеточного метаболизма в целом). Встречаются изменения размеров, морфологии и ультраструктуры митохондрий: набухание, вакуолизация, уменьшение количества и аномальная структура крист, кларификация матрикса и кристоллиз, появление плотных паракристаллических включений. В скелетно-мышечных патологиях часто описывают нарушения в пространственном распределении митохондрий, потерю митохондриальной биомассы, общую дезорганизацию митохондриальной сети, что указывает на дисрегуляцию биогенеза. Этому сопутствует подавление респираторной и метаболической функции митохондрий, признаками которого являются уменьшение содержания и активности компонентов дыхательной цепи и, как следствие, снижение синтеза АТФ; изменение митохондриального уровня кальция; усиление продукции АФК; восприимчивость к открытию МРТР; деполяризация митохондриального мембранного потенциала. Во многих исследованиях зафиксировано снижение экспрессии митохондриальных и ядерных генов, связанных с регуляцией энергетического метаболизма, а также изменение копийности и появление мутаций в мтДНК. Часто митохондриальные дефекты сочетаются с выраженными метаболическими нарушениями: изменением активности метаболических ферментов (гликолиза, цикла трикарбоновых кислот (ЦТК)), расстроены метаболизм глюкозы, транспортом и деградацией жирных кислот.

Наиболее подробно изменения в функционировании и «облике» митохондрий изучены в мышечной дистрофии Дюшенна (МДД), при которой в скелетной мускулатуре представлен целый спектр структурных и функциональных дефектов митохондрий и нарушений метаболизма. Эта тяжелая мышечная патология возникает вследствие генетически обусловленного дефицита дистрофина – основного структурного белка дистрофин-

ассоциированного гликопротеинового комплекса (ДАГ) в клетках сердца и скелетных мышц, который обеспечивает механическую связь между цитоскелетом и внеклеточным матриксом и отвечает за стабилизацию плазматической мембраны поперечно-полосатых мышечных клеток, в особенности при их сокращении. Признаки митохондриальной дисфункции в скелетной мускулатуре наблюдаются при миодистрофиях, вызванных мутациями других компонентов ДАГ – белков дистрогликанового и саркогликанового субкомплексов и взаимодействующих с ними белков базальной мембраны, в частности, ламинина. Причем это касается не только непосредственно структурных компонентов комплекса, но и белков, связанных с ними функционально, как, например, трансмембранная гликозилтрансфераза фукутин, которая участвует в гликозилировании α -дистрогликана и мутации которой также вызывают мышечную дистрофию, сопровождаемую митохондриальной дисфункцией.

Митохондриальная дисфункция считается ключевым моментом в развитии мышечных патологий, связанных с десмином. Десмин – основной цитоплазматический белок ПФ в мышечной ткани. Десминовые филаменты содействуют локализации и пространственному распределению митохондрий в мышечных клетках. Как полагают, десминовая сеть обеспечивает поддержку митохондрий в близости от миофибрилл, таким способом обеспечивая сопряжение энергетического «производства» и сократительного аппарата. Отсутствие или aberrantная агрегация десмина нарушает целостность и распределение митохондриальной сети, что выражается в многочисленных аномалиях энергетического метаболизма в мышечных клетках.

Что касается миопатий, ассоциированных с мутациями в других мышечных белках, митохондриальный метаболизм в этих патологиях изучен несравнимо хуже, и данные о функционировании митохондрий в несущих мутации скелетно-мышечных клетках, как правило, единичные и разрозненные. Самые первые сообщения о нарушении функции этих органелл в присутствии мутантных белков касались мышечных расстройств, ассоциированных с мутациями гена тяжелой цепи β -миозина. Есть отдельные сведения о признаках митохондриальной дисфункции при миофибриллярных миопатиях, связанных с мутациями в генах саркомерных и экстрасаркомерных белков: белков Z-дисков Cypher/ZASP, филамина С, миотилина; белка-шаперона теплового шока, участвующего в стабилизации десминовых филаментов α В-кристаллина. Получены первые доказательства аномальной функции митохондрий в мышечных клетках, экспрессирующих мутантные гены специфичного для мышц каркасного белка кавеол кавеолина-3 и предположительно занятого в транспортировке везикул транс-сарколеммального белка дисферлина.

Интересно, что отклонения в функционировании митохондрий наблюдаются и при мутациях генов, чьи продукты не имеют непосредственного отношения к структурной

организации мышечной клетки. Это, например, гены *DMPK* (*D*ystrophia *M*uotonica *P*rotein *K*inase) и *ZNF9/CNBP* (*Z*inc *F*inger 9/*C*ellular *N*ucleic acid *B*inding *P*rotein), «виновные» в развитии миотонической дистрофии 1 и 2 типа, соответственно, – наиболее распространенного типа мышечной дистрофии у взрослых. Эта патология связана с экспансией тринуклеотидов CTG в 3'-нетранслируемом районе *DMPK* и тетра nukлеотидной экспансией CCTG в интроне 1 гена *ZNF9/CNBP*, причем тяжесть заболевания коррелирует со степенью амплификации этих нуклеотидных последовательностей. Молекулярная этиология *DMPK*-ассоциированной миотонической дистрофии чрезвычайно комплексная, поскольку экспансия повторов оказывает влияние на регуляцию молекулярных процессов на разных уровнях: структуры хроматина и локального метилирования ДНК, репликации и стабильности ДНК, процессинга и трансляции РНК, регуляции микроРНК и протеостаза. Продукт этого гена – серин-треониновая киназа Rho-семейства, функции которой остаются большей частью неясными. Продукт гена *ZNF9* – цинк-фингерный связывающий РНК и одноцепочечную ДНК белок, наиболее распространенный именно в поперечно-полосатой мышечной ткани. Очевидно, что следствием мутирования этих генов является нарушение не столько структурной организации, сколько общей функциональной целостности мышечной клетки. Среди проявлений миотонической дистрофии обоих типов также зафиксированы признаки митохондриальной дисфункции, но ее вклад в развитие патологии только начинает проясняться.

Примечательно, что мутации структурных (и, как видим, не только) белков миоцитов приводят к дисфункции митохондрий так же, как аномалии белков, непосредственно связанных с митохондриями. Так, мутации гена *TAZ* ассоциированы с синдромом Барта – редким системным заболеванием, которое характеризуется кардио- и скелетной миопатией. Ген *TAZ* кодирует митохондриальный фермент тафазин – трансацилазу, задействованную в ремоделировании основного фосфолипида внутренней мембраны митохондрий кардиолипина. Кардиолипин обеспечивает стабильность структуры крист и участвует во многих важнейших процессах – биогенезе митохондрий, слиянии и делении, образовании крист, дыхании, импорте белка, митофагии и апоптозе. Таким образом, нарушение митохондриального здоровья вследствие генетических мутаций, независимо от каузального гена, оказывается критичным для таких энергозависимых тканей, как сердечная и скелетная мускулатура.

Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод, что митохондриальная дисфункция – практически универсальное проявление нарушения структурной и функциональной целостности мышечной клетки вследствие присутствия мутантных белков при генетически детерминированных заболеваниях скелетной мускулатуры (рисунок 5). Митохондрии – это уникальные органеллы, которые, по-видимому, служат сенсорным хабом, где сходятся сигналы, касающиеся структурно-функциональной целостности клетки.

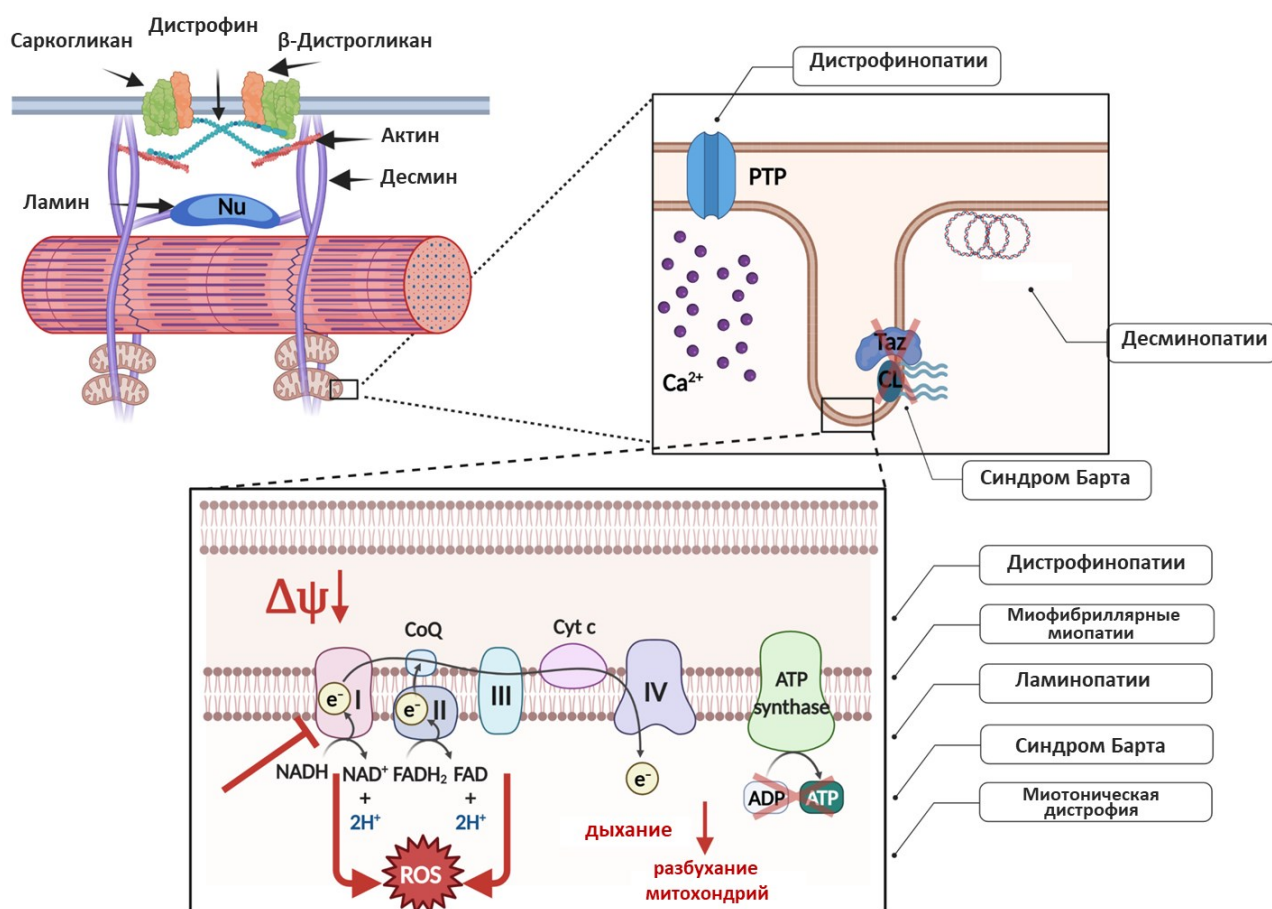


Рисунок 5. Мутации в различных генах, приводящие к нарушению структурной и функциональной целостности мышечной клетки, вызывают широкий спектр митохондриальных нарушений при специфических заболеваниях скелетной мускулатуры. Nu (nucleus) – ядро; PTP (Permeability Transition Pore) – пора, изменяющая проницаемость митохондрий; Taz – тафазин; Cl – кардиолипин; ROS (Reactive Oxygen Species) – активные формы кислорода (адаптировано из [8]).

Вероятно, митохондриальную дисфункцию можно рассматривать одновременно как причину и следствие в развитии патологии. Митохондриальные аномалии возникают на ранних этапах заболевания. При изучении дистрофин- и десмин-ассоциированных заболеваний на мышечных моделях обнаружилось, что нарушение внешнего вида и функции митохондрий является одним из самых ранних патологических изменений в скелетных мышцах и предшествует возникновению очевидных структурных дефектов МВ. Сбой биоэнергетического

метаболизма приводит к вторичному нарушению клеточных процессов, критически важных для функционирования скелетной мускулатуры, и дальнейшему прогрессу заболевания.

Наследственные нервно-мышечные расстройства клинически часто сочетаются с сердечным фенотипом, проявляющимся в виде кардиомиопатий и/или аритмических нарушений. Это объясняется сходством молекулярной и анатомической структурной организации сократительных тканей: большинство из каузальных генов кодируют структурные белки поперечно-полосатых мышечных клеток и экспрессируются как в клетках скелетных мышц, так и в кардиомиоцитах. При этом митохондрии кардиомиоцитов демонстрируют такой же широкий спектр ультраструктурных и функциональных дефектов, что обеспечивает поддержку взгляду на эти органеллы как ключевые соединительные элементы между метаболизмом и сокращением. Таким образом, в высокоструктурированной внутриклеточной конфигурации мышечных клеток митохондрии являются функциональными интеграторами структурной организации и клеточных метаболических/энергетических систем.

На современном этапе исследований практически невозможно сказать, возникают ли энергетические/метаболические изменения в сердечной и скелетно-мышечной тканях независимо, по одному и тому же механизму, в силу общего первичного структурного дефекта, и специфичны ли какие-то нарушения именно для скелетных миопатий. Необходимы также дальнейшие исследования, чтобы выяснить, существуют ли метаболические и/или энергетические изменения, характерные для каждой мутации/патологии.

Таким образом, становится все более очевидным, что изменения в производительности и качестве митохондрий играют центральную патофизиологическую роль в потере функции, связанной с различными мышечными заболеваниями. Регуляция морфологии, физиологии и патологической функции митохондрий может послужить основой для разработки терапевтических стратегий с целью улучшения метаболического здоровья скелетных мышц. Отсюда возникает необходимость в исследовании молекулярных механизмов, стоящих за митохондриальной дисфункцией в поперечно-полосатой мускулатуре.

1.3.3 Влияние мутаций ламина A/C на метаболизм

На основании предыдущих выводов представляется весьма вероятным, что действие мутаций ламинов, вследствие нарушения структурно/функциональной целостности мио ядер и мышечных клеток в целом, так же, как в приведенных выше примерах, должно затрагивать метаболическую/энергетическую систему клетки. Действительно, факт участия ламинов в метаболических путях стал ясен из исследований ламинопатий. Когда фибробласты кожи носителей мутаций *LMNA* (причем распределенных по всему гену) со скелетно-мышечными

ламинопатиями были подвергнуты протеомному анализу, то обнаружались значительные изменения в экспрессии гликолитических ферментов [12]. Аналогично, в клетках HeLa с экспериментально сниженной экспрессией ламина A/C протеомный подход выявил изменения в экспрессии белков, участвующих в клеточном метаболизме, что коррелировало с измененными паттернами метаболической активности [9]. Признаки митохондриальной дисфункции и оксидативного повреждения были обнаружены в первичных фибробластах человека, экспрессирующих мутации ламина A, связанные с резистентностью к инсулину и/или липодистрофией [10], и в фибробластах человека, в которых подавление экспрессии *LMNA* было достигнуто с помощью специфической siRNA [11].

В сердечной ткани трансгенных мышей с кардио-специфичной экспрессией ламина A с мутацией E82K, вызывающей дилатационную кардиомиопатию, наряду с нарушением целостности ЯО, наблюдались взбухшие митохондрии с уменьшенным количеством крист, а также практически на порядок увеличивался уровень апоптоза [114]. Секвенирование РНК в сердечной ткани мышей, нокаутных по гену *LMNA*, в процессе развития кардиомиопатии выявило масштабное подавление экспрессии генов, связанных с OXPHOS, митохондриальной функцией, метаболизмом почти всех питательных веществ (метаболических путей ЦТК, гликолиза, гликогенолиза, синтеза гликогена, β -окисления жирных кислот, деградации аминокислот) [206]. Это недавнее исследование подтвердило, что митохондриальная дисфункция и нарушение процесса окислительного фосфорилирования являются ранним событием в развитии патологии и могут возникать даже до появления фенотипических признаков кардиомиопатии.

Несмотря на то, что около 80% всех мутаций *LMNA* специфически влияют на поперечно-полосатую мышечную ткань, до сих пор была проведена только одна систематическая оценка метаболизма скелетной мускулатуры при этих нарушениях. Это было сделано в исследовании Бошмана и его коллег [13], которые наблюдали заметно усиленное, но неполное окисление жирных кислот в скелетных мышцах в сочетании со сниженным окислением глюкозы у пациентов с *LMNA*-ассоциированными FPLD и LGMD1B, *in vivo* и *in vitro* – в культивируемых миотрубках, полученных от пациентов. Транскриптомный анализ с использованием микрочипов показал подавление регуляции генов комплекса I дыхательной цепи и некоторых генов гликолиза в FPLD-миотрубках.

Таким образом, несколько линий доказательств связывают ламинины с регуляцией энергетического метаболизма. Очевидно, что для детализации специфичных для мутаций биоэнергетических профилей в скелетной мускулатуре при заболеваниях, ассоциированных с *LMNA*, требуются дальнейшие исследования

2. МЕТОДОЛОГИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 ОПИСАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ

Изучение событий, лежащих в основе проявления мутаций ламина А в мышечных клетках, и установление корреляций генотип-фенотип затрудняются редкостью этих заболеваний, инвазивностью отбора проб и ограниченной способностью первичных клеток пациентов к пролиферации/дифференцировке. В связи с этим для изучения молекулярного патогенеза и поиска эффективных терапевтических средств необходимы удобные и доступные экспериментальные модели *in vitro*. В области исследования особенностей клеток скелетной мускулатуры в нормальных и патологических условиях применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) еще относительно ограничено, и эта модель не является приоритетной в силу трудности получения зрелых, хорошо дифференцированных скелетно-мышечных производных из ИПСК человека в больших количествах с достаточной чистотой. В поиске оптимальных модельных клеток, способных наиболее полно воспроизводить дифференцировочные и патологические программы, представляется перспективным использовать иммортализованные клеточные линии, имеющие неограниченное число делений и стабильный фенотип вне зависимости от клеточного пассажа. Для изучения действия мутаций ламина А мы выбрали клеточную линию миобластов C2C12, полученную из сателлитных клеток скелетной мускулатуры мыши. Это общеизвестная, подробно охарактеризованная модельная система для изучения вопросов биологии мышц на клеточном и молекулярном уровне. При экспериментальном моделировании скелетно-мышечной дифференцировки миобласты претерпевают многоступенчатые строго регулируемые преобразования, которые включают пролиферацию, удлинение и слияние, в параллели с увеличением экспрессии мышечно-специфичных генов. В целом, миобласты C2C12 *in vitro* формируют зрелые контрактильные мультиядерные миотрубки и производят характерные мышечные сократительные белки.

Из множества мутаций ламина А для исследования механизмов их влияния на клетки скелетной мускулатуры мы выбрали две мутации, которые ассоциированы с разными клиническими формами ламинопатий.

G232E – спорадическая миссенс-мутация в 4 экзоне *LMNA*, приводящая к замене глицина на глутаминовую кислоту в 232 положении белка ламина А. Она была описана у пациентов с ранним дебютом тяжелой мышечной дистрофии с признаками аутосомно-доминантной EDMD и LGMD1B без поражения сердца [207], [208].

R482L – замена аргинина на лейцин в Ig-подобном домене белка в результате миссенс-мутации в 8 экзоне гена *LMNA*. 482 считается hotspot-кодоном, мутации в котором ответственны за подавляющее большинство (>80%) случаев проявления семейной частичной липодистрофии Даннигана (FPLD2). Кроме R482L, в этом положении описаны и хорошо известны мутантные замены аргинина на триптофан (R482W) и глутамин (R482Q).

FPLD2 – липодистрофический синдром. Он проявляется перераспределением жировой ткани – прогрессирующей потерей подкожной жировой ткани в нижней части тела (конечностях и туловище) и накоплением жировых отложений в верхней его части (на лице и шее). Этому часто сопутствуют тяжелые метаболические нарушения, включая резистентность к инсулину, непереносимость глюкозы, диабет и раннее начало атеросклероза [209], [210]. У пациентов с клиническими признаками липодистрофии, имеющих типичные FPLD-мутации, часто наблюдаются скелетно-мышечные нарушения разной степени тяжести [211], [212], [213]. Имеются доказательства нарушения метаболизма скелетной мускулатуры у FPLD-пациентов [13]. Экспрессия ламина А с мутацией R482L влияет на дифференцировку мышечных клеток *in vitro* и стимулирует образование внутриклеточных липидных капель [214].

По нашим данным, мутации G232E и R482L по-разному проявляют себя при эктопической экспрессии в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) жировой ткани (поскольку ламинопатии поражают преимущественно ткани мезенхимального происхождения, МСК являются релевантной клеточной моделью для изучения проявления мутаций *LMNA*). Так, эти мутации по-разному влияют на способность к клональной экспансии, экспрессию тканеспецифичных маркеров и дифференцировочный потенциал МСК в целом при их дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях [215], [216]. Кроме того, имеются ограниченные сведения о различии в механизмах действия этих мутаций. Экспрессия G232E-LMNA, но не R482L-LMNA, в трансфецированных клетках HeLa приводит к истощению содержания изоформ HP1 (Heterochromatin Protein 1) – белка, задействованного в организации транскрипционно неактивного гетерохроматина, путем индукции его протеасомной деградации [14]. В присутствии мутации G232E, но не R482L, при эктопической экспрессии мутантных ламинов в клетках HeLa нарушаются распределение эмерина в ЯО и клеточный ответ на повреждение ДНК, вследствие изменения взаимодействия мутантного ламина с хроматином [15]. У клеток с этой мутацией ламина резко снижена способность образовывать локусы репарации ДНК, содержащие фосфорилированный гистон H2AX – ключевой белок для сборки комплекса репарации в сайтах повреждения хроматина. Аминокислотная замена G232E затрагивает центральный стержневой домен белка и, как полагают, разрушительно влияет на сборку филаментов, что вызывает образование больших внутриядерных агрегатов [14], [15]. Напротив, миссенс-мутации в 482 кодоне *LMNA* не приводят к серьезным последствиям для

ядерной стабильности, но, по-видимому, изменяют взаимодействие мутантного ламина с белками-партнерами [16].

Очевидно, что за действием этих мутаций стоят разные патомеханизмы.

2.2 МАТЕРИАЛЫ

2.2.1 Химические реактивы

Наименование	Производитель
Бромфеноловый синий	020357, ЛенРеактив
Метанол (карбинол)	Вектон
Триптон	RTR.0500, Диаэм
Уксусная кислота	Ленреактив
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	Биолот
Экстракт дрожжевой	3369.0500, Диаэм
Acrylamide	A8887, Sigma-Aldrich
Agar Bacteriological	H-0102, Helicon
Agarose	Am-0710, Amresco
Ammonium persulfate	A3678, Sigma-Aldrich
Antimycin A	A8674, Sigma-Aldrich
BAM15 (N5,N6-bis(2-fluorophenyl)-[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pyrazine-5,6-diamine)	SML1760, Sigma-Aldrich
BSA (Bovine Serum Albumin)	A7906, Sigma-Aldrich
cOmplete™ (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail)	11873580001, Roche
DAPI (diamidino-2-phenylindole)	62248, Thermo Fisher Scientific
2-deoxy-D-glucose	D8375, Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	D8418, Sigma-Aldrich
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate)	E5134, Sigma-Aldrich
ExtractRNA, реагент для экстракции РНК	BC032, Евроген, Москва, Россия
Glucose	A2494001, Gibco

Glycerol	A2926, AppliChem
Glycine	A1076, AppliChem
HCl	Ленреактив
β -mercaptoethanol	M6250, Sigma-Aldrich
N,N'-Methylenebisacrylamide	146072, Sigma-Aldrich
Mito Tracker Red CMXRos	M7512, Thermo Fisher Scientific
Oligomycin	O4876, Sigma-Aldrich
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	26620, Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyde	A3813, BioChemica
PEI MAX (Linear Polyethylenimine Hydrochloride)	24765, Polysciences
Polybrene (Hexadimethrine bromide)	H9268, Sigma-Aldrich
Rotenone	R8875, Sigma-Aldrich
Sodium chloride	S6191, Sigma-Aldrich
Sodium deoxycholate	S1827, Sigma-Aldrich
SDS (sodium dodecyl sulfate)	L3771, Sigma-Aldrich
Sodium pyruvate	P5280, Sigma-Aldrich
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine)	T9281, Sigma-Aldrich
Trizma base	T6066, Sigma-Aldrich
Triton X-100	X100, Sigma-Aldrich
Tween 20 (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate)	P1379, Sigma-Aldrich

2.2.2 Буферные растворы

Буфер PBST (Phosphate Buffer Saline - Tween 20): PBS, 0,05% Tween 20

Буфер для лизиса клеток: 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 5 мМ ЭДТА и коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete™, Roche)

Трис-глициновый буфер для денатурирующего электрофореза по Лэммли: 25мМ Tris-base, 250 мМ глицин, 0,1% SDS

Буфер для внесения проб на электрофорез (4×): 200 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 40% глицерин, 4% SDS,

400 мМ β-меркаптоэтанол, ~0,01% бромфеноловый синий

Буфер для переноса: 25мМ Tris-base, 250 мМ глицин, 0,1% SDS, 10-20% метанол

Акриламид 30% (w/v): 29% акриламид (w/v), 1% N,N'-метиленбисакриламид (w/v), вода mQ

Буфер для приготовления разрешающего полиакриламидного геля: 375 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 0,1% SDS, 7-10% акриламид (акриламид:N,N'-метиленбисакриламид 29:1), 0,1% персульфат аммония, 0,08% TEMED

Буфер для приготовления концентрирующего полиакриламидного геля: 130мМ Tris-HCl, pH 6.8, 0,1% SDS, 5% акриламид (акриламид:N,N'-метиленбисакриламид 29:1), 0,1% персульфат аммония, 0,1% TEMED

Буфер для проведения агарозного гель-электрофореза (трис-ацетатный, ТАЕ): 1 мМ EDTA disodium salt, 40 мМ Tris-base, 20 мМ ледяная уксусная кислота

Среда LB: 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона, 5г/л NaCl

Среда LB с агаром: 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона, 5г/л NaCl, 15 г/л бактериологического агара

2.2.3 Антитела

Название	Источник	Производитель
Lamin A/C, NCL-LAM-A/C, anti-human	мышь	Leica Biosystems, Ветцлар, Германия
MF20, MAB4470	мышь	R&D Systems, Миннеаполис, США
Anti-Skeletal Myosin (FAST), M4276	мышь	Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США
Anti-Myosin (Skeletal, Slow), M8421	мышь	Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488, A11029	коза	Invitrogen, Юджин, Орегон, США
Immun-Star™ Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP Conjugate #170-5047	коза	Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США

2.2.4 Среды и реагенты для работы с культурами клеток

Среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 11995-065, Gibco™, Life Technologies, Блейсвик, Нидерланды

Opti-MEM®I Reduced Serum Medium, 31985062, Gibco™, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США

FluoroBrite™ DMEM, A1896701, Gibco™, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США

Seahorse XF Base Medium, 103335-100, Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США

DPBS, 14200-067, Gibco™, Life Technologies, Пейсли, Великобритания

FBS, Fetal Bovine Serum, 26140079, Gibco™, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США

Horse Serum, 16050, Gibco™, Life Technologies, Пенроуз, Окленд, Новая Зеландия

L-Glutamine, 200 mM, 25030081, Gibco™, Life Technologies, Пейсли, Великобритания

Pen Strep (Penicillin Streptomycin), 10000 U/ml, 15140122, Gibco™, Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США

Trypsin-EDTA, 0,5%, 15400054, Gibco™, Life Technologies, Пейсли, Великобритания

Blasticidine, 15205, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США

2.2.5 Наборы реактивов

Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit, 20020594, Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США.

Agencourt Ampure XP, PN#A63881, Beckman Coulter Life Sciences, Бреа, Калифорния, США

Qubit RNA HS Assay Kit, Q32852, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США

Qubit dsDNA HS Assay Kit, Q32854, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США

Agilent High Sensitivity DNA Kit for Agilent 2100 Bioanalyzer, 5067-462, Agilent Technologies, Пало-Альто, Калифорния, США

SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, 34096, Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США

Реакционная смесь для ПЦР с референсным красителем ROX Low ROX, PK154L, Евроген, Москва, Россия

Реакционная смесь для ПЦР с интеркалирующим красителем SYBR GREEN I и референсным красителем ROX SYBR+Low ROX, PK156L, Евроген, Москва, Россия

Набор MMLV RT kit с обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей, SK021, Евроген, Москва, Россия

Набор для выделения ДНК FlexiGene DNA Kit, 51206, Qiagen, Венло, Нидерланды

DC™ Protein Assay Kit, 500-0112, Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США

Набор реагентов для секвенирования по Сэнгеру BigDye Terminator v3.1, 4337455, Thermo Fisher Scientific, Остин, Техас, США

2.3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.3.1 Культивирование и дифференцировка клеток

Экспериментальная клеточная модель получена на основе клеточной линии миобластов мыши C2C12 (ATCC CRL-1772). Клетки C2C12 культивировали в среде для пролиферации (DMEM с добавлением 2 mM L-глутамин и 20% эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии антибиотиков (1% Pen Strep) в атмосфере 5% CO₂ и 37°C. Слияние некоторых клеток без воздействия внешних стимулов обычно наблюдалось в субконфлюэнтных культурах, что служит надежным индикатором готовности культуры к дифференцировке. Для индукции миогенной дифференцировки в субконфлюэнтной культуре пролиферативная среда заменялась на среду для дифференцировки (среда DMEM, содержащая 2 mM L-глутамин и 2% сыворотки лошадей, в присутствии антибиотиков (1% Pen Strep)). Среду для дифференцировки заменяли каждый день.

2.3.2 Пересев и заморозка клеток

Клетки пересевались при достижении 60% конфлюэнтности. Для этого культуральную среду убрали, монослой клеток промывали PBS и добавляли к нему 0.5% трипсин/EDTA, до полного покрытия монослоя. Инкубировали при 37°C. Открепление клеток от субстрата контролировали визуально, под инвертированным микроскопом. Трипсин нейтрализовали добавлением среды DMEM с 5% сыворотки. Суспензию клеток центрифугировали 5 минут при комнатной температуре и 300 g, осадок ресуспендировали в свежей полной среде, и необходимое количество клеток помещали в культуральную посуду с теплой средой.

Линии замораживались в логарифмической фазе роста. Клетки снимали трипсином, как описано, осадок ресуспендировали в холодной сыворотке с 10% DMSO. Медленно замораживали в контейнерах Gibco™ при -80°C. Криовials с замороженными клетками переносили в жидкий азот.

2.3.3 Плазмиды и мутагенез

Лентивирусный экспрессионный вектор со вставкой кДНК гена *LMNA* человека pCDHblast MCSNard OST-LMNA (плазида #22661) был получен от Addgene (Уотертаун, Массачусетс, США). Для получения конструкций с мутациями *LMNA* использовали стратегию сайт-специфического мутагенеза целой плазмиды. Коротко, протокол вначале включает стадию

ПЦР с мутагенными праймерами, за которой следует стадия расщепления продуктов ПЦР-реакции рестриктазой DpnI для разрушения метилированной родительской плазмиды дикого типа, и, наконец, трансформацию компетентных клеток для репарации разрывов. Праймеры, содержащие желаемые мутации, представлены в таблице 3. Референсная последовательность транскрипта NM_170707 использовалась в качестве матрицы при проектировании праймеров.

Таблица 3. Праймеры для сайт-специфического мутагенеза

Название праймера	Последовательность праймера (5'- 3')
hLMNA_R482L forward	TTACC(G/T)GTTCCACCAAAGTTCACCCTGAAGG*
hLMNA_R482L reverse	GGAAC(C/A)GGTAAGTCAGCAAGGGATCATCTCCA*
hLMNA_G232E forward	CTGGTGGAGATTGACAATG(G/A)GAAGCAGCGTGAGTTTGAG*
hLMNA_G232E reverse	CTCAAACCTCAGCTGCTTC(C/T)CATTGTCAATCTCCACCAG*

¹ Исходные нуклеотиды выделены жирным шрифтом.

Реакционная смесь для ПЦР содержала 5 мкл 5× реакционного буфера, 1,25 мкл каждого праймера (10 мкМ), 1 мкл 10 мМ смеси dNTP, 50 нг матрицы ДНК, 1 мкл DMSO, 0,5 мкл высокоточной ДНК-полимеразы Q5[®]High-Fidelity DNA Polymerase (M0491, 2000 единиц/мл; New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США) и воду без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. Условия ПЦР были следующими: начальная денатурация при 98°C в течение 30 секунд, затем 30 циклов денатурации при 98°C в течение 10 секунд, отжиг при 60°C в течение 20 секунд и удлинение праймера при 72°C в течение 5 минут 20 секунд. Успешность амплификации контролировали разделением продуктов реакции путем электрофореза. Непосредственно после завершения циклов ПЦР 15 мкл реакции загружали в 1%-ный агарозный гель. Оставшиеся продукты амплификации обрабатывали чувствительным к метилированию ферментом рестрикции DpnI для удаления исходной метилированной плазмиды из смеси перед трансформацией в *Escherichia coli*. Каждая реакция (общий объем 10 мкл) состояла из 8 мкл реакции ПЦР, 1 мкл буфера 10× FastDigest и 1 мкл рестриктазы DpnI FastDigest (Thermo Scientific, Вильнюс, Литва) и проводилась при 37°C в течение 30 минут.

После тепловой инактивации фермента при 80°C в течение 5 мин мутантные плазмиды трансформировали в компетентные клетки *Escherichia coli* XL-1 Blue (#CC001, Евроген, Москва, Россия). Процедуру трансформации проводили стандартно, используя метод теплового шока. Вкратце, 5 мкл продуктов расщепления DpnI и 100 мкл компетентных клеток смешивали и инкубировали в течение 30 минут на льду, затем подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 45 секунд и снова помещали в лед на 2 минуты. После этого добавляли среду LB, и трансформированные бактерии инкубировали, энергично встряхивая, при 37°C в течение 1 часа. После инкубации бактерии высевали на селективную среду с агаром, содержащую ампициллин

(100 мкг/мл), и инкубировали при 37°C в течение ночи. Полученные колонии затем подсчитывали и анализировали для определения эффективности реакций мутагенеза. От десяти до двадцати колоний были случайным образом отобраны из каждой трансформации, из них выделяли плазмиды для скрининга мутантов. Для оценки точности реакций мутагенеза было проведено секвенирование по Сэнгеру вновь синтезированных мутантных плазмид с использованием праймеров, перечисленных в таблице 4.

Таблица 4. Праймеры для секвентного анализа мутагенеза

Название праймера	Последовательность праймера (5'-3')
hLMNA_R482L seq-forward	GCTGGTCGAGTACCAGGAGCTTCTGGACATCA
hLMNA_R482L seq-reverse	GCCGTAGGCAGGCTGTTCCCGCAGCCCCAGGT
hLMNA_G232E seq-forward	GGATGAGATGCTGCCGGCGG
hLMNA_G232E seq-reverse	GCTGGGCAGAGAGGCTGTTCG

Секвенирование осуществляли на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) с использованием набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1. и в соответствии с протоколом производителя. Данные секвенирования анализировали с помощью программного обеспечения Geneious.

2.3.4 Производство лентивируса, трансдукция и получение постоянных клеточных линий

Лентивирусы были получены путем временной котрансфекции клеток НЕК293Т экспрессионным вектором и вспомогательными плазмидами с использованием линейного полиэтилененимин гидрохлорида (PEI). PEI был получен от Polysciences (PEI MAX 40K), и исходный раствор 1 мг/мл был приготовлен в соответствии с инструкциями производителя. Лентивирусные пакующие плазмиды любезно предоставлены Д.Троно (Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария) [217]. Клетки НЕК293Т выращивали в 100-миллиметровых чашках Петри до достижения конfluence от 60 до 80%. Среда для культивирования готовилась на основе DMEM (Gibco™), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глутамин, 1% Pen Strep. За час до трансфекции культуральную среду меняли на свежую. Для трансфекции 100-миллиметровых чашек использовали 15 мкг экспрессионного вектора (pCDHblast MCSNard OST-LMNA, дикого типа либо с мутациями), 5,27 мкг плазмиды капсида pMD2.G и 9,73 мкг пакующей плазмиды pCMV-dr8.74psPAX2. PEI и смесь плазмидных ДНК непосредственно перед использованием разводили до равных объемов бессывороточной средой Opti-MEM®I (Gibco™). Полиплексы получали путем осторожного добавления PEI в раствор плазмид с использованием соотношения ДНК (мкг) к PEI (мкл) 1:2. Трансфекционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 мин и

добавляли по каплям в клетки НЕК293Т. На следующий день среду меняли на свежую, и клетки инкубировали в течение 24 часов в атмосфере 5% CO₂ при 37°C для получения продукции вируса с высоким титром. Инфекционную вирусосодержащую среду собирали, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре и фильтровали через мембранные фильтры (PVDF) с размером пор 0,45 мкм (Jet Biofil, Гуанчжоу Китай). Полученный лентивирус концентрировали из среды методом ультрацентрифугирования при 20 000 g в течение 2 часов, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере PBS с BSA (1% w/v) и замораживали в аликвотах при -80°C. Концентрированные вирусные частицы добавляли непосредственно к клеткам C2C12 при пересеве, через час после трипсинизации, в среде DMEM с 10% FBS. Для облегчения проникновения вируса в клетки вместе с ним в среду добавляли полибрен (гексаметрина бромид) в конечной концентрации 8 мкг/мл. 6 ч спустя вирусную среду заменяли на полную культуральную среду для пролиферации (DMEM + 20% FBS). Клетки C2C12 пассировали через 48 часов после заражения, и затем трансдуцированные клетки отбирались путем селекции по устойчивости к антибиотику бластицидину (10 мкг/мл). Культуральную среду, содержащую бластицидин, меняли каждый день с периодической трипсинизацией клеток, когда они достигали 80% конfluence, чтобы постепенно удалять мертвые или умирающие клетки. После полной гибели клеток в контрольных группах (неинфицированные клетки при селекции на бластицидине), примерно по прошествии недели отбора, популяции, устойчивые к антибиотикам, были размножены и впоследствии использовались непосредственно для экспериментального анализа.

2.3.5 Анализ клеточной пролиферации

Миобласты мыши C2C12, трансдуцированные WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA, высевали в 6-луночные планшеты с плотностью 20000 клеток на лунку и культивировали при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Через каждые 24 часа в течение 3 дней клетки снимали раствором трипсина/ЭДТА и подсчитывали в счетной камере. Для каждой клеточной линии анализировались четыре отдельные лунки в каждый контрольный момент времени. Для сравнения скорости пролиферации клеточных линий при расчете времени удвоения популяции клеток (PDT, population doubling time) использовалась следующая формула:

$$PDT = t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)],$$

где t - время культивирования клеток (единица измерения: ч), N₀ - начальное количество клеток, а N_t – количество клеток после культивирования.

Результаты усреднялись, и рассчитывалось стандартное отклонение. Статистическую

значимость определяли с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

2.3.6 Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки, посеянные на покровные стекла, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буфере в течение 10 мин при 4°C, промывали фосфатно-солевым буфером, а затем инкубировали в PBS, содержащим 0.2% Triton X-100 в течение 5 мин для пермеабиллизации. После этого клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером. Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в PBS с 10% эмбриональной бычьей сыворотки в течение 30 минут при комнатной температуре. После блокирующий раствор удаляли и к клеткам добавляли первичные антитела к ламину А человека (NCL-LAM-A/C, anti-human, Leica Biosystems) в растворе 1% эмбриональной бычьей сыворотки на фосфатно-солевом буфере. После часовой инкубации клетки дважды промывали PBS и на 45 минут оставляли в темноте в растворе вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™, Invitrogen) в фосфатно-солевом буфере с 1% эмбриональной бычьей сыворотки. Затем клетки снова промывали PBS и ядра окрашивали DAPI. Микроскопический анализ проводили на приборе Axio Observer.D1 (Zeiss, Германия). Обработку изображений производили в программах Axiovision Rel.4.7 и Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия).

2.3.7 Прижизненное окрашивание митохондрий

Для окрашивания митохондрий специфический краситель Mito Tracker добавляли к живым клеткам в среде FluoroBrite™ DMEM (Gibco™) в концентрации 250 нМ на 30 минут при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем клетки промывали от красителя промывали PBS и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 минут при комнатной температуре с последующим окрашиванием DAPI. Микроскопический анализ проводили на приборе Axio Observer (Zeiss, Германия), в среде FluoroBrite™ DMEM (Gibco™).

2.3.8 Анализ морфологических характеристик дифференцированных миотрубок

Для определения морфологических характеристик миотрубки визуализировали с помощью красителя MitoTracker, а ядра окрашивали DAPI. Размер миотрубок определяли, измеряя их ширину в поперечном сечении и длину в продольном сечении. Репрезентативное количество снимков было сделано для каждого тестируемого условия. Коэффициент слияния рассчитывался как отношение числа ядер в миотрубках с тремя или более ядрами к общему числу ядер.

2.3.9 Иммуноблоттинг

Клетки лизировали буфером, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 5 мМ EDTA и коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete™, Roche) в течение 30 минут на льду. Клеточные лизаты разделяли денатурирующим электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле по методу Лэммли [218] а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (1620115, Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США), в течение часа при 100V. Процедура электрофореза и переноса проводилась в системе Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Вестерн-блоттинг проводили с использованием стандартной процедуры, с блокировкой в 5% обезжиренном молоке в течение 1 часа и промывками в PBS, содержащем 0,05% Tween 20 (PBST). Мембраны инкубировали при постоянном перемешивании при 4°C в течение ночи с первичными антителами (разведенными в PBST с 5% обезжиренным молоком) к белкам-мишеням: Anti-Skeletal Myosin (FAST) (M4276, Sigma-Aldrich), Anti-Myosin (Skeletal, Slow) (M8421, Sigma-Aldrich), тяжелая цепь миозина (MF20, MAB4470, R&D Systems). Детекцию осуществляли с применением методики усиления хемилюминесценции. Для этого использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (#170-5047, Bio-Rad), и ультрачувствительный субстрат SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Изображение визуализировали при помощи геле-документирующей системы Fusion Fx (Vilber Lourmat, Марн-ла-Валле, Франция). Для анализа изображения использовали программное обеспечение FusionCapt Advance FX7.

2.3.10 Относительная количественная оценка содержания митохондриальной ДНК с использованием ПЦР в реальном времени

Относительное число копий мтДНК оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени и корректировали путем одновременного измерения содержания ядерной ДНК. Общую ДНК из клеток C2C12 выделяли с помощью набора FlexiGene DNA Kit (51206, Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию и химическую чистоту ДНК измеряли с применением спектрофотометра для малых объемов NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, Калифорния, США). Ген *Kcnj13* (калиевый канал внутреннего выпрямления, подсемейство J, член 13) был выбран в качестве эталонного гена, представленного одной копией (ядДНК). Подробная информация о праймерах, амплифицирующих фрагмент митохондриальной ДНК и гена *Kcnj13* мыши, приведена в таблице 5.

Таблица 5. Праймеры для количественной оценки митохондриальной ДНК (по [219])

Название праймера	Последовательность праймера (5'- 3')
Для митохондриальной ДНК мыши:	
musMT553F23	GCCAGAGAАCTACTAGCCATAGC
musMT668R2	AGCAAGAGATGGTGAGGTAGAGC
Для гена <i>Kcnj13</i> мыши:	
mus4987F25	GGATGAGAGAGAGAAGCACAAGTGG
mus5140R25	CTGTATGACCAACCTTGGACATGAT

Количественную ПЦР в реальном времени проводили в термоциклере Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Реакционная смесь для ПЦР с интеркалирующим красителем SYBR GREEN I и референсным красителем ROX SYBR+Low ROX (PK156L, Евроген, Москва, Россия) использовалась для мониторинга амплификации в режиме реального времени. Реакционная смесь содержала 100 нг исходной ДНК-матрицы. Профиль термического циклинга был следующим: начальная стадия активации при 95°C в течение 10 минут, за которой следовали 40 циклов при 95°C в течение 15 секунд (стадия денатурации), 62,5°C в течение 30 секунд и 70°C в течение 30 секунд (отжиг и удлинение). В точности амплификации целевых ампликонов удостоверялись путем анализа кривой плавления. Все реакции были дополнительно протестированы электрофорезом в агарозном геле после проведения количественной ПЦР. Результаты ПЦР в реальном времени были рассчитаны в терминах значений порогового цикла (Ct). Количество копий мтДНК для каждого образца определяли относительно единственной копии ядерного гена с использованием формул:

$$\Delta Ct = Ct \text{ ядДНК} - Ct \text{ мтДНК}$$

$$\text{Относительное содержание митохондриальной ДНК} = 2^{\Delta Ct}$$

2.3.11 Выделение РНК и обратная транскрипция

Суммарную РНК из клеток выделяли с использованием реагента для экстракции РНК ExtractRNA (BC032, Евроген, Москва, Россия). Измеряли концентрацию РНК и оценивали химическую чистоту образцов с помощью спектрофотометра для малых объемов NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Калифорния, США). кДНК синтезировали из 500 нг тотальной РНК с использованием набора MMLV RT kit с обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей (SK021, Евроген, Москва, Россия), в термоциклере Veriti™ (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США).

2.3.12 ПЦР в режиме реального времени

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали 5× реакционную смесь qPCR mix-HS SYBR+ROX (PK156L, Евроген, Москва, Россия), в которую в соответствии с протоколом добавляли кДНК-матрицу, прямой и обратный праймеры и воду. Количественную ПЦР в реальном времени проводили в термоциклере Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Для расчета относительной экспрессии исследуемых генов применили метод сравнения пороговых уровней амплификации ($\Delta\Delta C_t$), с нормализацией на уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). Праймеры сконструированы с применением инструмента Primer-BLAST, интегрированного в международную базу данных NCBI (National Center for Bio**l**ogical Information, Национальный центр биотехнологической информации США). Последовательность праймеров представлена в таблице 6.

Таблица 6. Праймеры для количественной ПЦР в реальном времени

Ген (мышь)	Ориентация	Последовательность праймера (5'-3')
<i>GAPDH</i>	Fw	GGATCTGACGTGCCGCCTG
	Rv	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTGC
<i>Myrk</i>	Fw	CCTGTGATGGGCCTGGTTTGTC
	Rv	GGTTCATCAAAGTCGGCCAGTGC
<i>Myrx</i>	Fw	GGACCACTCCCAGAGGAAGGA
	Rv	GGACCGACGCCTGGACTAAC
<i>Myog</i>	Fw	GAGACATCCCCCTATTTCTACCA
	Rv	GCTCAGTCCGCTCATAGCC
<i>Myh1</i>	Fw	GCTGAGAGAAGCTACCACATT
	Rv	ACAAAGGCGTAGTCGTATGG
<i>Myh3</i>	Fw	CTATGCCACCTTCGCTACAACAG
	Rv	CAGTGCAGAGACGGTTTGGAAGG
<i>Myh7</i>	Fw	TGCCCGATGACAAAGAAGAG
	Rv	GTCACCGTCTTGCCATTCT

Для анализа экспрессии гена *LMNA* человека в трансгенных миоблестах мыши C2C12 использовали технологию TaqMan (TaqMan[®] Gene Expression Assays): 5× реакционную смесь qPCR mix-HS Low ROX (PK154L, Евроген, Москва, Россия) и флюоресцентно-меченый зонд Hs00153462 Lmna FAM (Applied Biosystems, Великобритания).

2.3.13 Митохондриальный стресс-тест

Параметры клеточного дыхания измеряли с помощью анализатора клеточного метаболизма XFe24 (Agilent Technologies, Санта Клара, Калифорния, США), который позволяет в режиме реального времени определять скорость потребления кислорода клетками (OCR, Oxygen Consumption Rate) и скорость внеклеточного закисления среды (ECAR, Extracellular Acidification Rate). Вкратце, клетки C2C12 высевали в 24-луночный микропланшет (Agilent Technologies, Санта Клара, Калифорния, США) с плотностью 20000 клеток на лунку и оставляли для размножения при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Когда конfluence составляла примерно 80%, клетки индуцировали к дифференцировке. При достижении дифференцированного состояния выполняли анализ. Для этого клетки инкубировали в течение 60 минут без CO₂ при 37°C в бессывороточной среде Seahorse XF Base Medium (103335-100, Agilent Technologies). Среда содержала 1 мМ пирувата натрия, 2,5 мМ глюкозы и 1 мМ L-глутамина, pH доводили до 7,4. Измерения OCR и ECAR проводились одновременно в течение 3 минут с 3-минутным перемешиванием и 2-минутными периодами ожидания в начальных условиях и после добавления следующих ингибиторов: ингибитор АТФ-синтазы олигомицин (2 мкМ); митохондриальный протонофорный разобщитель ВAM15 (10 мкМ); ингибиторы комплексов цепей переноса электронов I и III ротенон (1 мкМ) и антимицин А (1 мкМ), соответственно. Данные были нормализованы по содержанию белка. После анализа тестовую среду удаляли, и к клеткам добавляли буфер для лизиса, содержащий коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete™, Roche). Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка DC™ Protein Assay Kit (Bio-Rad).

После измерений были рассчитаны следующие параметры: немитохондриальное потребление кислорода (OCR) = (минимальное значение OCR после инъекции ротенона/антимицина А); базальное дыхание = (последнее OCR перед инъекцией олигомицина) – (немитохондриальное OCR); утечка протонов = последнее значение OCR перед инъекцией олигомицина) – (минимальное значение OCR после инъекции олигомицина) – немитохондриальное OCR; максимальное дыхание = (максимальное OCR после инъекции ВAM15) – (немитохондриальное OCR); продукция АТФ = (последнее OCR перед инъекцией олигомицина) - (минимальное OCR после инъекции олигомицина); сопрягающая способность = (продукция АТФ)/(базальное дыхание) × 100; запасная дыхательная способность в % = ((максимальное дыхание)/(базальное дыхание)) × 100; коэффициент клеточного дыхательного контроля = (максимальное дыхание)/(утечка протонов); соотношение OCR/ECAR = наибольшее из 3 значений OCR, деленное на соответствующее значение ECAR. Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism версии 8.4.1 для Windows (программное обеспечение GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США, www.graphpad.com).

2.3.14 Гликолизный стресс-тест

Гликолитическую функцию миотрубок C2C12 исследовали с применением анализатора клеточного метаболизма Seahorse XFe24 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), согласно протоколу производителя. Недифференцированные миобласты C2C12 высевали с плотностью 20000 клеток на лунку на микропланшет Seahorse XF24 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) и получали дифференцированные миотрубки. Перед проведением анализа культуральную среду меняли на среду для анализа (Seahorse XF Base Medium (103335-100, Agilent Technologies), с добавлением 1 мМ L-глутамина, pH 7.4), и клетки помещали в инкубатор без CO₂ при 37 °С на один час. Гликолитическую активность оценивали по скорости внеклеточного закисления среды (ECAR). Сначала ECAR измеряли в исходных условиях, в которых клетки инкубировали в среде без глюкозы. Затем производили измерения на каждом этапе при последовательном добавлении 10 мМ глюкозы (для индукции гликолиза), 2 мкМ олигомицина (для индукции максимальной скорости клеточного гликолиза вследствие ингибирования АТФ-синтазы) и, наконец, 50 мМ 2-дезоксид-D-глюкозы (для ингибирования гликолиза).

ECAR, предшествующий инъекции глюкозы, представляет собой негликолитическое закисление. После добавления глюкозы гликолиз рассчитывали путем вычитания ECAR негликолитического закисления из наибольшего значения ECAR. После инъекции олигомицина гликолитическую способность рассчитывали как разность наибольшего значения ECAR и базального ECAR. Разница между гликолитической способностью и скоростью гликолиза определяет гликолитический резерв. Средние значения из 6-8 репликатов были измерены и представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (SEM). После анализа тестовую среду удаляли, и к клеткам добавляли буфер для лизиса, содержащий коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete™, Roche). Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка DC™ Protein Assay Kit (Bio-Rad). Значения ECAR были нормализованы к общему количеству белка.

2.3.15 Конструирование библиотек и секвенирование РНК

Суммарную РНК экстрагировали из клеток реагентом ExtractRNA (#BC032, Евроген, Москва, Россия). После количественной оценки, проводимой при помощи флуориметра Qubit 2.0 с использованием набора для анализа Qubit RNA HS Assay Kit (Q32852, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США), 1 мкг РНК использовали для создания библиотек с сохранением информации о направлении цепей, с использованием набора Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (20020594, Illumina). Для каждого образца для РНК-секвенирования использовали три независимых биологических репликата. Все этапы инкубации и ПЦР-

амплификации проводили на настольном 96-луночном термоциклере Veriti™ (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США).

Библиотеки были сконструированы в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем. Вкратце, протокол включал на первом этапе отбор поли(А)+РНК с помощью магнитных частиц с конъюгированными олиго(dT). После очистки мРНК фрагментировали с использованием двухвалентных катионов при повышенной температуре. Фрагментированную РНК подвергали обратной транскрипции, чтобы получить первую цепь кДНК. Затем первую цепь использовали в качестве матрицы для получения двухцепочечной кДНК. Двухцепочечная кДНК аденилировалась на 3'-концах для обеспечения точного лигирования адаптеров. Модифицированные адаптерами матрицы подвергали 12 раундам амплификации с индексированными праймерами (TruSeq RNA CD Indexes, 20019792, Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США), для обогащения и селективной амплификации молекул ДНК с адаптерами. Фракционирование по размеру и очистка готовых библиотек были выполнены с помощью магнитных частиц Agencourt Ampure XP (PN#A63881, Beckman Coulter Life Sciences). Количественный выход был определен с помощью набора для анализа Qubit dsDNA HS Assay Kit (Q32854, Life Technologies). Качество сконструированных библиотек оценивали с помощью Agilent High Sensitivity DNA Kit, с применением анализирующей системы Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Пало-Альто, Калифорния, США).

Библиотеки были мультиплексированы, кластеризованы и секвенированы на анализаторе Illumina HiSeq 2500 (набор реагентов TruSeq v3), как рекомендовано производителем, с использованием режима одноконцевого чтения 50 пар нуклеотидов и считыванием баркода из восьми оснований.

2.3.16 Обработка данных РНК-секвенирования

Исходные данные были получены в формате FASTQ от Illumina HiSeq 2500, качество данных оценивалось с помощью инструмента FastQC (v0.11.5) (FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (Andrews S., 2010); доступно онлайн по адресу: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Длина прочтений составила 50 пар оснований. Фильтрация ридов и удаление адаптерных последовательностей выполнены с помощью программы fastp (v0.20.0) [220]. Прочтения были выровнены на геном мыши с использованием маппера STAR v2.604a [221] с референсным геномом GRCm38.p6 первичной сборки и аннотацией GENECODE M22. Выровненные риды подсчитывались с помощью программы featureCounts v.1.6.4 [222]. Топ 14321 наиболее экспрессируемых гена были выбраны после фильтрации, квантильной и логарифмической нормализации для анализа дифференциальной экспрессии. Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) определяли

с использованием пакета для R DESeq2 [223] с попарным сравнением условий. Значения p-value скорректированы с использованием процедуры Бенджамини-Хохберга и отфильтрованы с применением критерия $FDR = 0,01$; только гены с изменением \log_2 больше 1 по модулю считались дифференциально экспрессируемыми. Для поиска активированных/подавленных молекулярных путей был проведен анализ обогащения набора генов (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) с использованием пакета fgsea R [224]. Кроме того, был проведен анализ сигнальных путей для ДЭГ с использованием онлайн-инструмента MSigDB [225]. Пути взяты из баз данных биологических процессов Gene Ontology, Hallmark, MSigDB и KEGG Metabolic pathways; значительно обогащенные пути были отфильтрованы с уровнем $FDR = 0,05$. Необработанные данные секвенирования и таблица экспрессии доступны в Gene Expression Omnibus (GEO) под регистрационным номером GSE150365.

2.3.17 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводился с использованием пакета GraphPad Prism версии 8.4.1 для Windows (программное обеспечение GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США, www.graphpad.com).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Получение и валидация экспериментальной клеточной модели

Для изучения влияния мутаций ламина А на дифференцировку и метаболизм скелетной мускулатуры мы получили и использовали экспериментальную клеточную модель – генетически модифицированные миобласты линии C2C12. Для модификации генома миобластов мыши применили трансдукцию лентивирусными векторами, несущими ламин А человека дикого типа (WT) и ламин А с мутациями G232E и R482L (рисунок 6). Таким образом, в экспериментах использовались три постоянные клеточные линии: WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA [226].

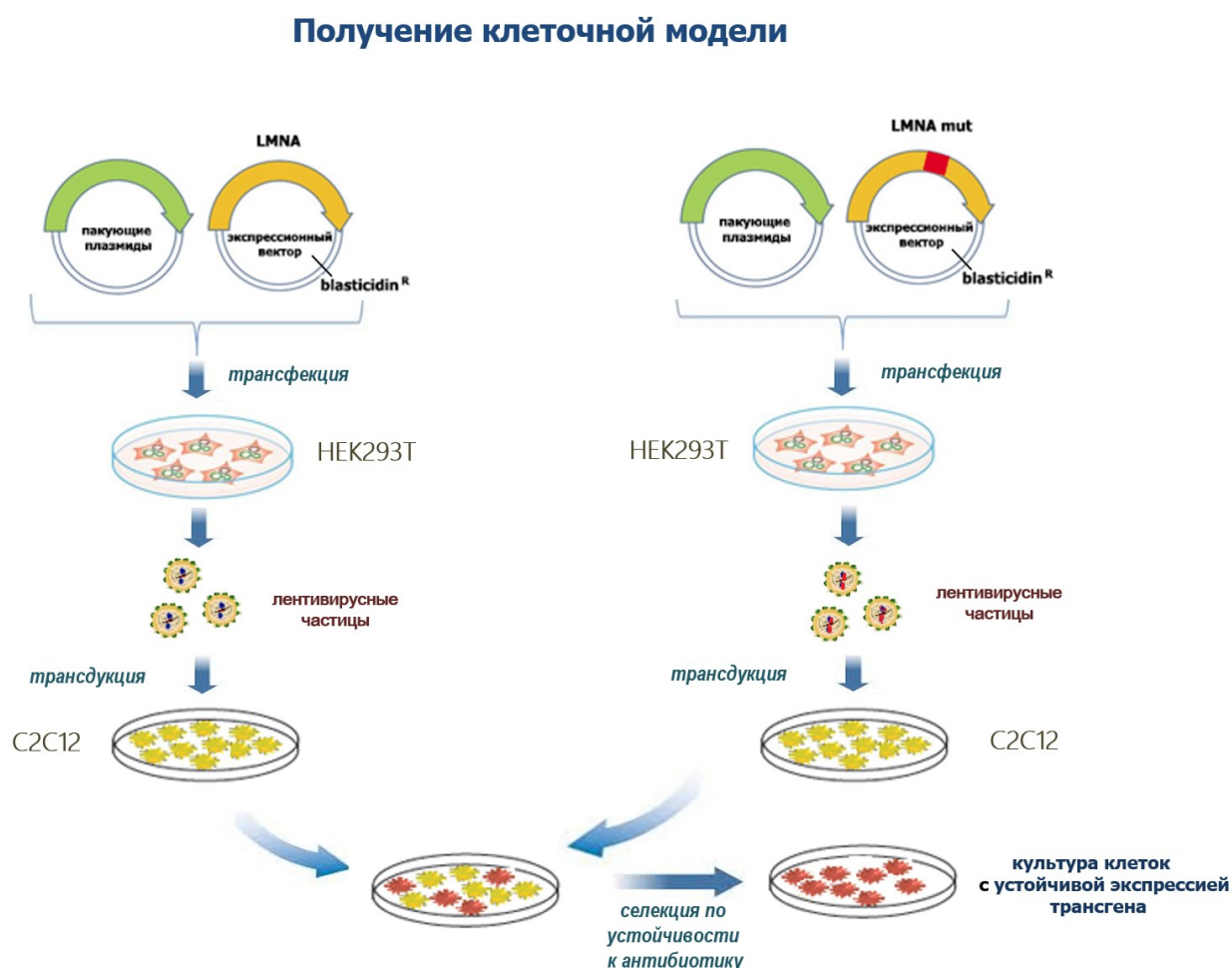


Рисунок 6. Получение экспериментальной клеточной модели. Для генерации векторных конструкций, несущих мутации гена *LMNA*, использовали стратегию направленного сайт-специфического мутагенеза целой плазмиды. Лентивирусы получали путем временной

котрансфекции клеток НЕК293Т целевым экспрессионным вектором и вспомогательными плазмидами с использованием линейного полиэтиленимин гидрохлорида. Концентрированные вирусные частицы добавляли непосредственно к клеткам С2С12 при пересеве, через час после трипсинизации, затем трансдуцированные клетки отбирались путем селекции по устойчивости к антибиотику бластицидину. После полной гибели клеток в контрольных группах (неинфицированные клетки при селекции на бластицидине) популяции, устойчивые к антибиотикам, были размножены и впоследствии использовались непосредственно для экспериментального анализа.

3.1.1 Верификация экспрессии трансгенов

Эффективность экспрессии лентивирусных трансгенов и корректность внутриклеточной локализации трансгенного белка в модифицированных клетках С2С12 контролировали методами ПЦР в реальном времени и иммуоцитохимическим окрашиванием антителами, специфичными к ламину А человека, которые не проявляют кросс-реактивности с ламинном А мыши (рисунок 7). Мы удостоверились, что все три полученные генетически модифицированные линии экспрессируют ламин А человека на уровне мРНК (рисунок 7Б) и белка, локализованного в клеточных ядрах (рисунок 7А). Ламин А, экспрессируемый с выбранного нами лентивирусного вектора, колокализуется с эндогенными ламинами А и В1 в разных клеточных типах и хорошо охарактеризован в деталях, в частности, в отношении пост-трансляционных модификаций [227], [228].

3.1.2 Исследование влияния экспрессии мутантных ламинов на морфологию ядер

Были обнаружены изменения морфологии клеточных ядер в клетках С2С12 в присутствии мутаций ламина А G232E/R482L. Мутантные ламины образуют внутриядерные агрегаты, что вызывает пузырение ядерной мембраны (рисунок 7А), аналогично ранее опубликованным данным [210], [214], [229], [230], [231].

3.1.3 Миогенная дифференцировка трансгенных линий

Далее удостоверились в способности трансдуцированных миобластов всех трех трансгенных линий к дифференцировке (рисунок 7Б-Г). С2С12 представляет собой иммортализованную линию миобластов мыши, первоначально полученных из сателлитных клеток мышцы бедра. Это быстропролиферирующие клетки. Общим принципом дифференцировки миобластов является контактное ингибирование и депривация сыворотки. После удаления митогенов из среды миобласты в субконфлюэнтной культуре постепенно

удлиняются, принимают веретенообразную форму и затем сливаются с другими миобластами, образуя группы выровненных мультиядерных миотрубок.

Было подтверждено, что все три трансгенные линии, трансдуцированные лентивирусным ламином А, успешно дифференцируются с формированием зрелых мультиядерных миотрубок (рисунок 7В). При этом уровень экспрессии мРНК LMNA человека значительно увеличивается в дифференцированных миотрубках по сравнению с недифференцированными миобластами, как и ожидалось [232] (рисунок 7Б). Кроме того, ламин А человека хорошо детектируется антителами в миоядрах дифференцированных миотрубок всех трех трансгенных линий (рисунок 7Г).

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.

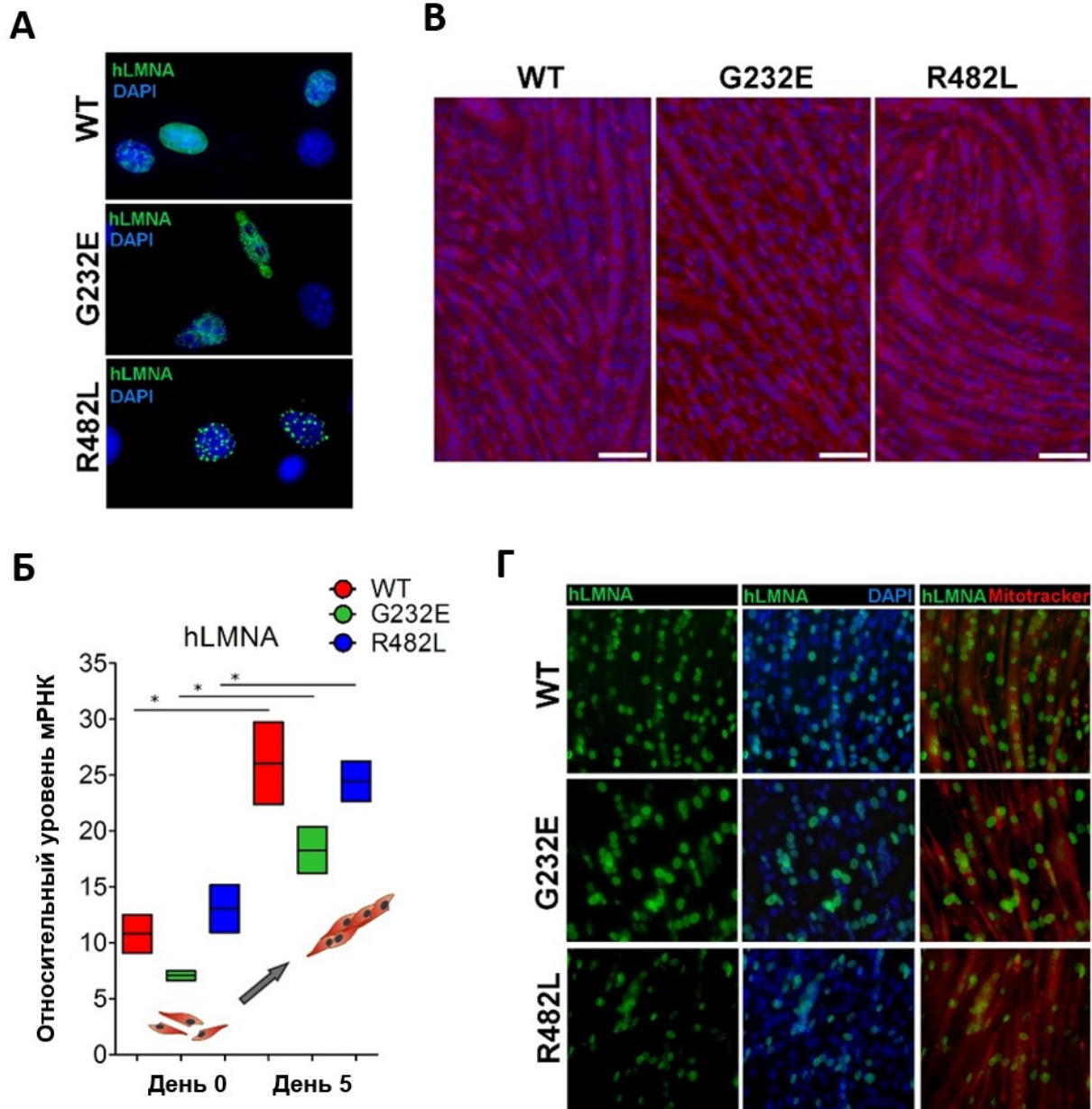


Рисунок 7. Валидация экспериментальной клеточной модели: (А) Верификация экспрессии трансгенного ламина А человека в миобластах мыши C2C12. Клетки были окрашены антителами к ламину А, распознающими только ламин А человека и не проявляющими кросс-реактивности с ламин А мыши. Ядра с мутантными формами 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. Ядра визуализированы окраской DAPI (синий), миотрубки - с помощью красителя (Mitotracker), специфичного для митохондрий (красный).

3.2 ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИОБЛАСТОВ C2C12

3.2.1 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 клеточные линии, экспрессирующие ламин А с мутациями G232E и R482L, продемонстрировали сниженную скорость пролиферации по сравнению с линией WT-LMNA. При этом наименьший пролиферативный потенциал и наибольшее время удвоения клеточной популяции наблюдались у миобластов линии G232E-LMNA (рисунок 8А).

3.2.2 Анализ экспрессии ключевых генов, регулирующих ранние стадии миогенеза

Существенная задержка пролиферативной активности миобластов G232E/R482L-LMNA может быть связана со спонтанным переходом к состоянию коммитирования к дифференцировке, вызванным мутантными ламинами. Для проверки этой гипотезы была исследована экспрессия генов, регулирующих ранние этапы формирования мышечных волокон – факторов слияния миобластов *Myomaker* (*Mymk*) и *Myomixer* (*Mymx*) [233], [234], а также миогенного фактора транскрипции миогенина (*MyoG*). Миогенин контролирует слияние миоцитов путем регуляции экспрессии необходимых для этого процесса факторов, в частности, непосредственно связываясь с промотором *Mymk* [235]. Действительно, была обнаружена повышенная экспрессия *MyoG* и *Mymk* (но не *Mymx*), как в клетках G232E-LMNA, так и в клетках R482L-LMNA (рисунок 8Б).

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 (рисунок 8В).

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

ДЭГ были проанализированы между всеми возможными парами клеточных линий (рисунки 8Г, 8Д) с последующей идентификацией биологических функций, связанных с ДЭГ. Мы обнаружили, что значительная доля генов с повышенной регуляцией экспрессии как в парах WT/G232E, так и в парах WT/R482L (рисунок 8Г) принадлежит путям, регулирующим

миогенез, как показано в таблице 7. Кроме того, при анализе совпадающих ДЭГ в паре R482L/G232E оказалось, что клетки G232E-LMNA также характеризовались выраженным усилением регуляции сигнальных путей миогенеза (таблица 7). Детали анализа приведены в Приложении (рисунки 1 и 2).

В совокупности эти данные показывают, что миобласты C2C12, содержащие мутации G232E-LMNA и R482L-LMNA, проявляют сниженную способность к пролиферации и повышенную экспрессию генов, связанных с программой мышечной дифференцировки, даже в отсутствие дифференцировочных стимулов.

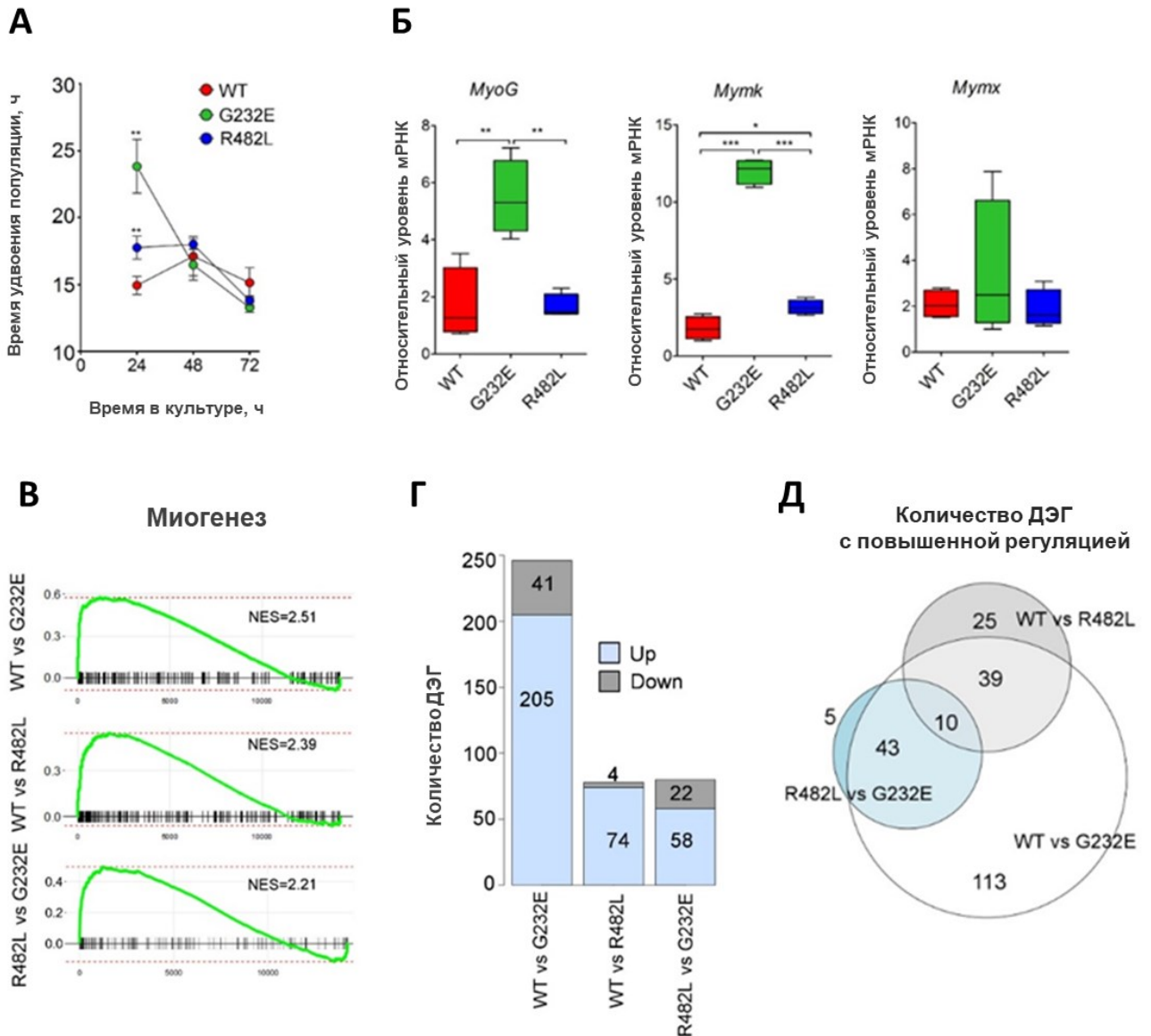


Рисунок 8. Индуцированные мутациями G232E-LMNA и R482L-LMNA изменения функциональных свойств миобластов C2C12: (А) Оценка времени удвоения клеточных популяций для трансдуцированных клеточных линий C2C12 WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA в 3 временных точках в течение 72 часов культивирования. Представлены средние значения \pm SEM (Standard Error Mean); (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 по сравнению с G232E-LMNA, WT 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 (log2 fold change>1, p-adjusted <0,01); (Д) Диаграммы Венна для ДЭГ с повышенной регуляцией.

Таблица 7. Сигнальные пути, контролируемые ключевые процессы развития и функционирования мышечной ткани, ассоциированные с дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ) в контрольной и трансгенных линиях (p<0.0001)¹

	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

¹ 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 – несущественно.

3.3 ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ЛАМИНА НА МИОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ

3.3.1 Влияние мутаций ламина на морфологические и функциональные характеристики миотрубок

Все линии трансгенных миобластов очень хорошо реагировали на стимулы дифференцировки (рисунок 7B). Тем не менее, обнаружались 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 (рисунок 9A). Различия касались и морфологии миотрубок. Хотя диапазон ширины миотрубок в культуре был одинаков во всех образцах (рисунок 9Б), средняя ширина миотрубок была значительно меньше в линии G232E-LMNA (рисунок 9Б), также как фракция крупных массивных миотрубок (рисунок 9В).

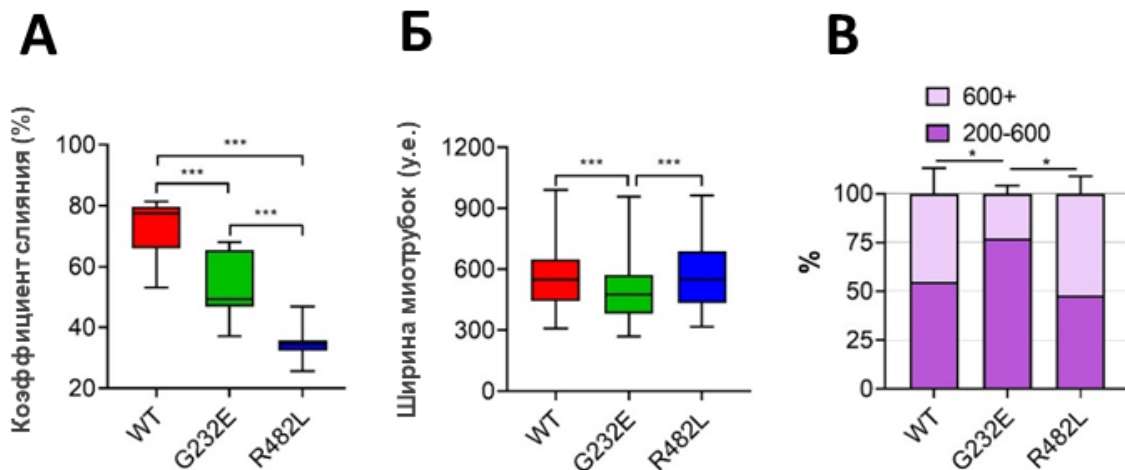


Рисунок 9. Морфологические и функциональные характеристики миотрубок, полученных при стимуляции мышечной дифференцировки трансгенных линий WT-LMNA, G232E-LMNA и R482L-LMNA. (А) Коэффициент слияния, рассчитанный как процент ядер, включенных в дифференцированные миотрубки (подсчет по независимым фотографиям, $n=8$); (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).

3.3.2 Анализ экспрессии тканеспецифичных маркеров при дифференцировке трансгенных линий

Экспрессия мРНК мышечно-специфичных генов *Mutk* и *Mutx*, регулирующих слияние миобластов на ранних стадиях миогенеза, не коррелировала со снижением коэффициента слияния в линиях R482L/G232E: экспрессия *Mutk* существенно увеличилась во всех образцах при переходе с 0-го дня на 2-й и стабилизировалась на этом уровне до конца эксперимента (рисунок 10А); экспрессия *Mutx* достигла максимума ко второму дню в обеих мутантных линиях и показала небольшое, но значительное увеличение со 2-го по 4-й день в линии WT. Удивительно, но уровни экспрессии *Mutx* были значительно выше в мутантных линиях, чем в линии, трансдуцированной ламином дикого типа (рисунок 10Б). Паттерны экспрессии миогенного регуляторного фактора *Myog*, который контролирует переход от ранних стадий дифференцировки к поздним [236], [175], были аналогичны паттернам *Mutx* со стабилизацией на 2-й день и повышением уровней в мутантных линиях (рисунок 10В).

Экспрессия мРНК различных изоформ тяжелых цепей миозина оказалась подчинена двум разным закономерностям (рисунки 10Г-Е). Экспрессия эмбриональной изоформы *Myh3* увеличивалась ко второму дню во всех образцах, а затем стабилизировалась на аналогичном уровне (рисунок 10Г). 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 (рисунки 10Д, 10Е). При этом экспрессия медленной изоформы оказалась значительно более высокой в мутантных линиях. В подтверждение, представленность белковых изоформ *Myh1/Myh7*, проанализированная методом Вестерн-блота, оказалась согласованной с паттернами экспрессии мРНК в терминально дифференцированных миотрубках (рисунок 10Ж).

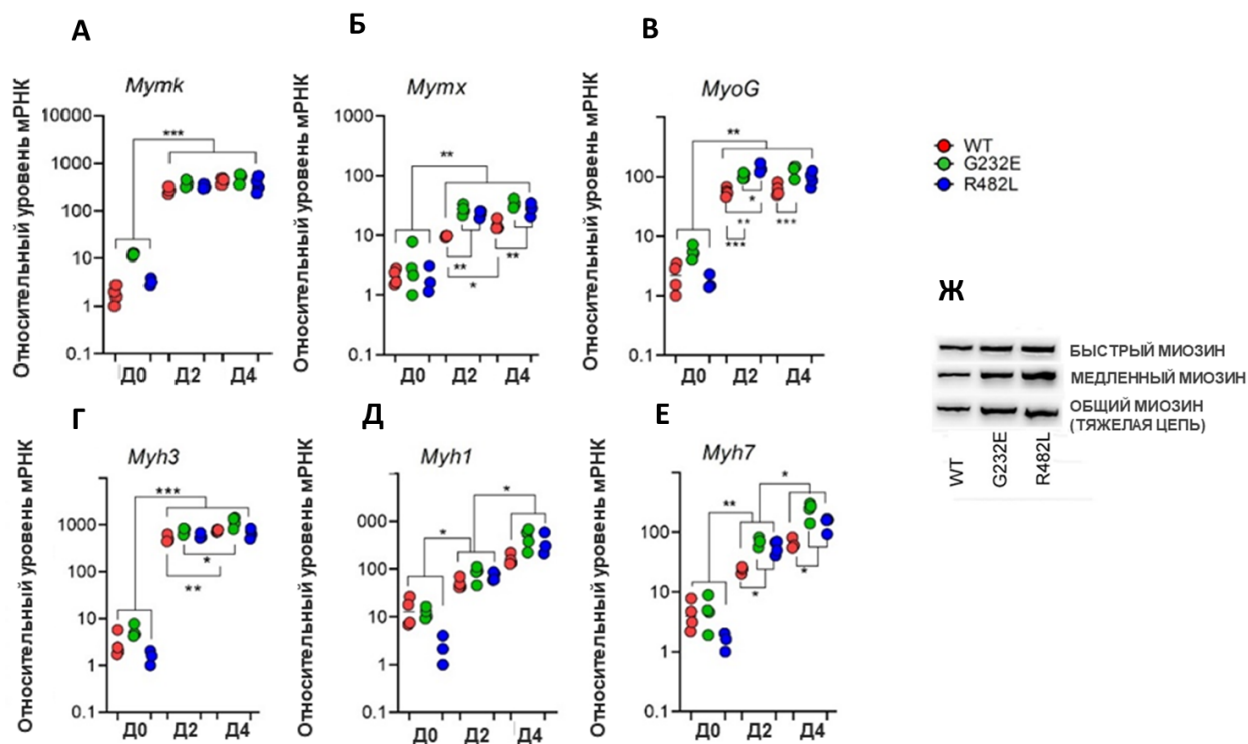


Рисунок 10. Экспрессия мышечно-специфических маркеров в трансгенных культурах. (А-В) Динамика экспрессии генов, контролирующих слияние миобластов (*Myrk*, *Myrx*) и миогенного регуляторного фактора *MyoG* (n=4; среднее+SEM; **p<0.01; ***p<0.001; тест Манна-Уитни); (Г-Е) Динамика экспрессии генов изоформ 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); (Ж) Экспрессия белков-маркеров миогенеза (общего миозина, медленной изоформы *Myh7* и быстрых миозинов *Myh1/Myh*) в культурах на 4-й день после индукции миогенной дифференцировки.

3.3.3 Анализ транскриптомов трансгенных линий в процессе миогенной дифференцировки

Для получения представления о специфичном для каждой мутации ответе на стимуляцию миогенеза был выполнен анализ транскриптомов клеток всех трех линий в процессе дифференцировки. Для каждой трансгенной клеточной линии определили гены, дифференциально экспрессирующиеся на ранних (с 0 по 2-й день) и поздних (со 2-го по 4-й день) стадиях миогенной дифференцировки. Затем определили сигнальные пути, к которым принадлежат дифференциально экспрессирующиеся гены, и провели анализ обогащения набора генов (GSEA) по функциональной принадлежности, чтобы идентифицировать значительно

обогащенные пути. Как анализ дифференциальной экспрессии, так и GSEA показали одинаковые картины обогащения (рисунки 11А, 11Б). Как видно из рисунка 11А (слева), во всех трансгенных образцах во время перехода с 0-го дня на 2-й день наблюдается усиление регуляции путей, которые контролируют различные аспекты развития скелетной мускулатуры, включая дифференцировку и слияние миобластов, сборку миофибрилл, развитие аппарата сокращения мышц (организация структуры актомиозина), дифференцировку и развитие миотрубок. Во время поздней фазы дифференцировки пути, которые регулируют дифференцировку и слияние миобластов, были стабилизированы, подтверждая вышеописанные данные для экспрессии специфических генов (рисунки 10А-В, 10Е). Во время перехода со 2-го по 4-й день во всех образцах мы обнаружили усиление регуляции путей, контролирующих созревание МВ (рисунок 11А, слева). Таким образом, исходя из анализа транскриптома, можно сделать вывод, что все трансгенные линии обладают сходным потенциалом контроля миогенеза с хорошо различимыми ранними и поздними фазами мышечной дифференцировки.

При сравнении мутантных клеточных линий с линией дикого типа по их способности проходить через последовательные стадии миогенеза в них были обнаружены значительные изменения (рисунок 11А, справа). Во-первых (и это хорошо согласуется с приведенными выше данными (рисунок 8В, таблица 7)), регуляция миогенных путей была значительно усилена в миобластах, несущих мутантные ламины (рисунок 11А, справа, день 0). Во-вторых, было обнаружено, что, в то время как пути, которые контролируют ранние этапы миогенеза, такие как слияние и дифференцировка миобластов, не различались между всеми трансгенными линиями, пути, которые контролируют формирование и созревание волокон, были активированы в обеих мутантных линиях даже на ранних этапах миогенеза. Эти пути оставались активированными в G232E-LMNA, но не в R482L-LMNA, до конца эксперимента.

В норме дифференцировка и пролиферация мышечных клеток демонстрируют обратную зависимость, и терминальная дифференцировка сопровождается окончательным выходом из цикла деления. Поэтому можно предположить, что описанные различия между линиями WT и G232E/R482L-LMNA могут быть связаны с нарушением координации выхода из клеточного цикла и дифференцировки. Для проверки этой гипотезы была проанализирована динамика сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл в трансгенных линиях во время дифференцировки. Действительно, обнаружилась обратная взаимосвязь между путями, стимулирующими миогенез и прогрессию клеточного цикла: пути, контролирующие репликацию ДНК и гены-мишени TF E2F, необходимые для активного клеточного цикла [175], оказались постоянно подавлены во всех линиях с 0-го по 4-й день; однако, пути, контролирующие G1/S- и G2/M-переходы, были стабилизированы на 2-й день в линиях WT-LMNA и R482L-LMNA, но не в G232E-LMNA (рисунок 11Б, слева). Кроме того, когда сравнили

экспрессионную активность путей клеточного цикла между линиями в каждый момент времени, то обнаружили понижение регуляции путей, активирующих прогрессию клеточного цикла в мутантных пролиферирующих миобластах, и существенное повышение регуляции этих путей в мутантных клетках после стимуляции миогенеза как на ранних, так и на поздних стадиях дифференцировки (рисунок 11Б, справа). В совокупности эти данные указывают на значительное нарушение регуляции координации динамики клеточного цикла и миогенной дифференцировки в мутантных трансгенных миобластах C2C12, содержащих мутации ламина А G232E и R482L (рисунок 11В).

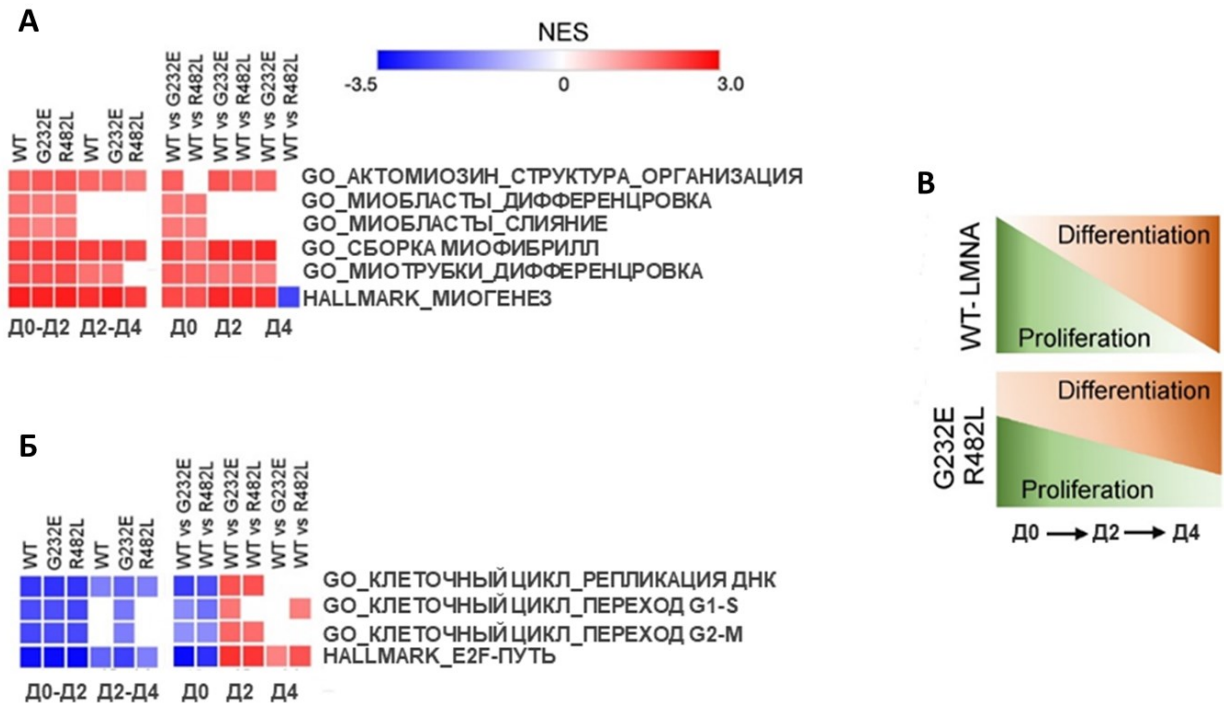


Рисунок 11. Анализ экспрессионных путей, связанных с пролиферацией и миогенезом, в трансгенных культурах. (А, Б) Результаты анализа обогащения набора генов, визуализированные в виде тепловой карты нормализованного показателя обогащения (NES, Normalized Enrichment Score), которые отображают активируемые и подавляемые пути, относящиеся к контролю миогенеза (А) и динамики клеточного цикла (Б); (В) Обобщенная диаграмма, иллюстрирующая значительную дисрегуляцию в координации динамики клеточного цикла и миогенной дифференцировки в миобластах G232E/R482L-LMNA.

3.4 ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ МУТАНТНЫХ ЛАМИНОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ БИОЭНЕРГЕТИКУ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ МИОТРУБОК C2C12

3.4.1 Исследование клеточной биоэнергетики дифференцированных культур WT/G232E/R482L-LMNA

Миогенная дифференцировка тщательным образом согласована с регуляцией энергетического метаболизма, поэтому мы предположили, что нарушение координации в программе дифференцировки в миобластах C2C12, несущих мутации ламина А G232E/R482L, может сопровождаться изменениями метаболического статуса дифференцированных миотрубок G232E/R482L-LMNA. Чтобы исследовать общее влияние экспрессии мутантного *LMNA* на функцию митохондрий, использовали технологию Seahorse: тесты на митохондриальное дыхание в условиях стресса были проведены на дифференцированных миотрубках C2C12, экспрессирующих ламин А дикого типа и ламин А с мутациями G232E и R482L. Этот метод позволяет количественно оценить параметры митохондриального дыхания с помощью специальных протоколов, разработанных для разделения фракций дыхания действием фармакологических агентов. Митохондриальное дыхание оценивается по скорости поглощения кислорода (OCR , Oxygen Consumption Rate). В исследуемые образцы поэтапно добавляют модуляторы митохондриальной функции: вначале ингибитор АТФ-синтазы олигомицин, затем разобщающий агент ВАМ15, и, наконец, блокаторы комплексов ЭТЦ I и III ротенон и антимицин А, соответственно. Действие олигомицина приводит к редукции АТФ-связанного дыхания; ВАМ15 «разваливает» протонный градиент и разрушает митохондриальный мембранный потенциал путем переноса протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, в результате чего потребление кислорода комплексом IV достигает максимума; ингибирование комплексов I и III полностью останавливает митохондриальное дыхание.

Измерения скорости потребления кислорода (OCR), показателя митохондриального дыхания, в реальном времени в миотрубках линий WT/G232E/R482L-LMNA показаны на рисунке 12А.

Максимальное дыхание и резервная дыхательная емкость (определяемая как разница между максимальным и базальным дыханием) оказались самыми низкими у линии R482L-LMNA (рисунки 12Б, 12В). Миотрубки, несущие эту мутацию, не могли поддерживать максимальный уровень OCR после добавления разобщителя ВАМ15; при этом потребление кислорода снизилось до уровня базального даже перед добавлением ротенона/антимицина А (рисунок 12А), что подразумевает, что на исходном уровне митохондрии в этих клетках работают близко к своей максимальной дыхательной способности, и их стимулирование

оказывается неустойчивым, что и выражается в меньшей резервной емкости.

Базальное дыхание (потребление кислорода, измеренное до добавления ингибиторов), показатель энергетических потребностей клетки в исходных условиях, оказалось самым высоким у клеток линии G232E-LMNA (рисунок 12А). Максимальная скорость дыхания и АТФ-связанное дыхание в миотрубках этой линии также были значительно выше, чем двух других (рисунки 12Б, 12Г). В целом, это свидетельствует об увеличенной потребности и обороте АТФ в этих клетках.

Однако увеличение базального и максимального OCR сопровождалось индуцированной утечкой протонов (рисунок 12Д). Утечка протонов является преимущественным механизмом, ответственным за неполное сопряжение субстратного окисления и синтеза АТФ, и ее увеличение наблюдалось у обеих мутантных трансгенных линий (рисунок 12Д). Последующий анализ показателей контроля дыхания предоставил дополнительное подтверждение потенциальной митохондриальной дисфункции в мутантных *LMNA*-линиях. Было обнаружено, что 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 (рисунки 12Е, 12Ж). В совокупности эти данные могут указывать на разобщающее действие мутаций *LMNA* на митохондриальное дыхание и снижение эффективности окислительного фосфорилирования.

Технология Seahorse позволяет одновременно с измерением потребления кислорода оценивать скорость внеклеточного закисления среды (ECAR), которая является побочным процессом при гликолизе и может, таким образом, служить его показателем. Учитывая, что миотрубка является метаболически высокоактивным клеточным типом, который в значительной степени зависит от OXPHOS, мы определили соотношение OCR/ECAR, чтобы оценить относительный вклад гликолиза и митохондриального дыхания в выработку энергии [237]. Более высокое соотношение OCR/ECAR указывает на то, что энергия в основном вырабатывается за счет митохондриального OXPHOS, тогда как более низкое – преимущественно за счет гликолиза. Соотношение OCR/ECAR 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 (рисунок 12З). В целом, это свидетельствует о том, что митохондрии миотрубок WT-LMNA обладают большим потенциалом для субстратного окисления и оборота АТФ. Чтобы убедиться, что наблюдаемые различия в дыхании не были следствием измененного содержания митохондрий в миотрубках с мутантными трансгенами, определили соотношение мтДНК к ядерной ДНК и не обнаружили различий между клеточными линиями ни в миобластах, ни в миотрубках (Приложение, рисунок 3).

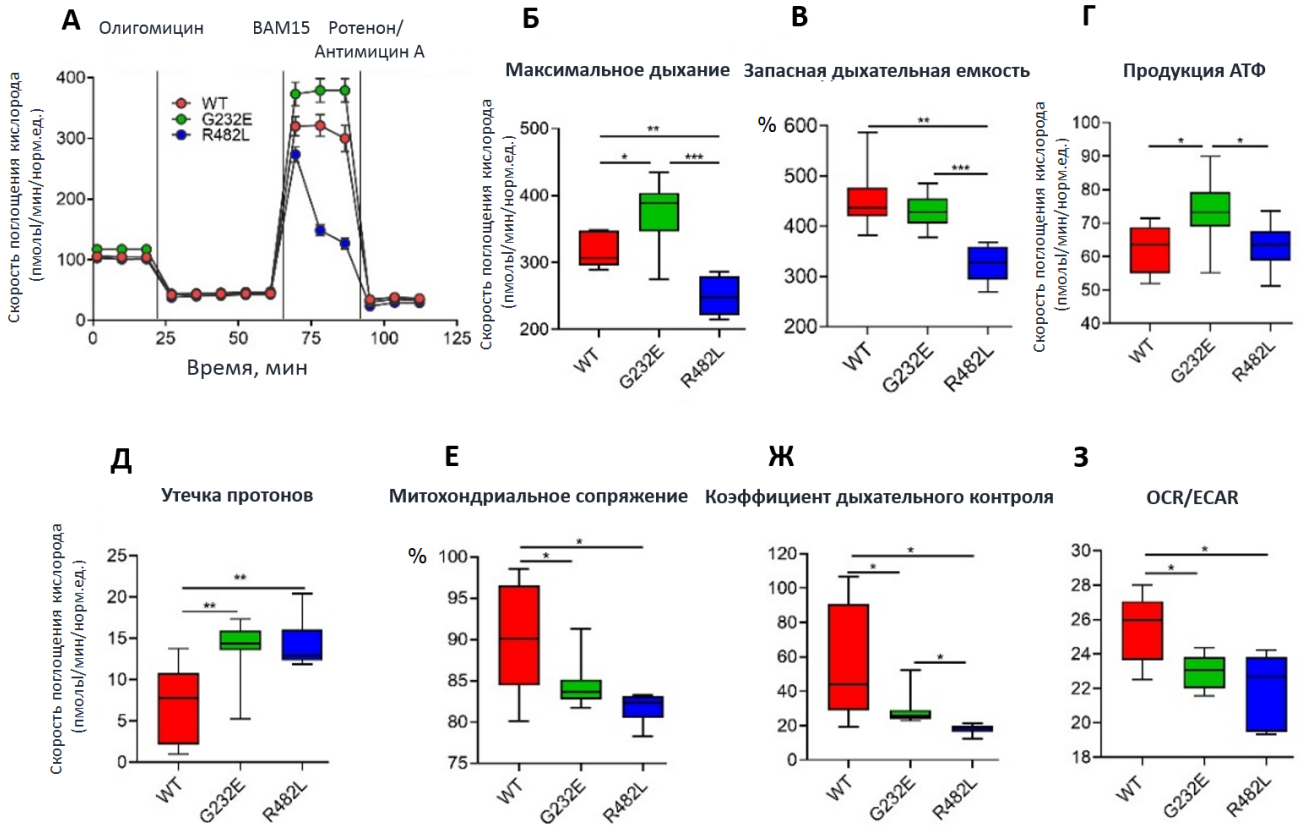


Рисунок 12. Стресс-исследование митохондриальной функции в миотрубках C2C12, несущих лентивирусные ламины А человека WT/G232E/R482L-LMNA. (А) Профили OCR (скорости поглощения кислорода) для миотрубок, экспрессирующих WT/G232E/R482L-LMNA; (Б–З) Параметры дыхательной функции митохондрий, определенные по 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 при максимальном дыхании. OCR и ECAR измерялись одновременно. Все данные рассчитаны по 6-8 лункам микропланшета Seahorse и нормализованы на общее содержание белка в каждой лунке. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; t-критерий Стьюдента. «Плавающие» столбики отображаются со средним, минимальным и максимальным значениями.

3.4.2 Стресс-исследование гликолиза

Для того чтобы завершить биоэнергетический анализ, провели стресс-тест на гликолиз. Метод измерения интенсивности клеточного гликолиза заключается в определении показателей ECAR. Стресс-тест вначале определяет гликолитическую функцию в базовых условиях, когда гликолиз стимулируется добавлением глюкозы, после чего ингибитор АТФ-синтазы олигомицин блокирует окислительное фосфорилирование и тем самым переключает генерацию энергии на гликолиз. Это сопровождается увеличением ECAR до максимальных значений, определяемых

гликолитическим потенциалом клетки. Наконец, последнее измерение производится в присутствии 2-дезоксид-D-глюкозы, которая полностью нарушает гликолитическую функцию. Измерения ECAR в реальном времени показаны на рисунке 13А. Миотрубки G232E/R482L-LMNA демонстрировали сниженные скорости гликолиза по сравнению с линией WT-LMNA (рисунок 13Б). В то же время, миотрубки линии G232E-LMNA обладают наибольшим гликолитическим резервом (рисунок 13В). Он определяется как разница между максимальной и базальной скоростью гликолиза и отражает способность клетки увеличивать скорость гликолиза при растущей потребности в энергии. В совокупности эти результаты указывают на измененные метаболические свойства линий G232E-LMNA и R482L-LMNA по сравнению с WT-LMNA.

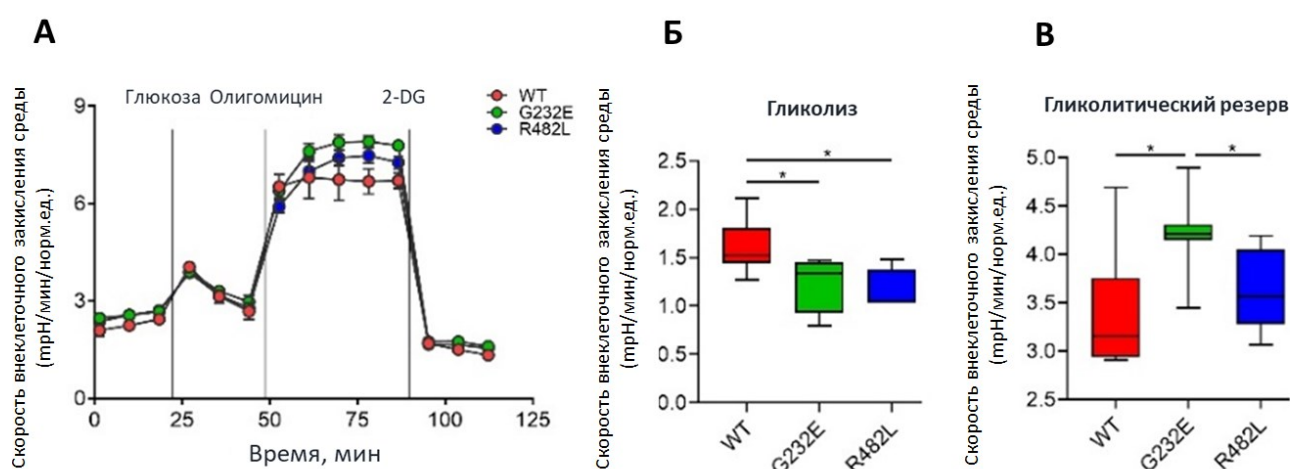


Рисунок 13. Стресс-исследование гликолитической активности миотрубок C2C12, несущих лентивирусные ламины А человека WT/G232E/R482L-LMNA. (А) Кинетические профили клеточного закисления среды (ECAR) в миотрубках, экспрессирующих WT-LMNA/G232E-LMNA/R482L-LMNA. ECAR измерялся в режиме реального времени, как показано; 2-DG - 2-дезоксид-D-глюкоза. Параметры гликолитической функции, определенные по профилю ECAR: (Б) Гликолиз и (В) Гликолитическая резервная емкость. Все данные рассчитаны по 6-8 лункам микропланшета Seahorse и нормализованы на общее содержание белка в каждой лунке. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ***; $p < 0,001$; t-критерий Стьюдента. «Плавающие» столбики отображаются со средним, минимальным и максимальным значениями.

3.4.3 Транскриптомный анализ сигнальных путей, регулирующих клеточную биоэнергетику

Сравнительный анализ сигнальных 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 (рисунок 14). Экспрессионные пути, регулирующие гликолиз, а также клеточный ответ на уровень 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 и снижена в линии R482L по сравнению с линией WT, либо повышена в линии G232E по сравнению с линиями WT и R482L.

Таким образом, биоэнергетическое профилирование и анализ транскриптома показали специфические для мутаций *LMNA* изменения в биоэнергетике клеток скелетной мускулатуры.

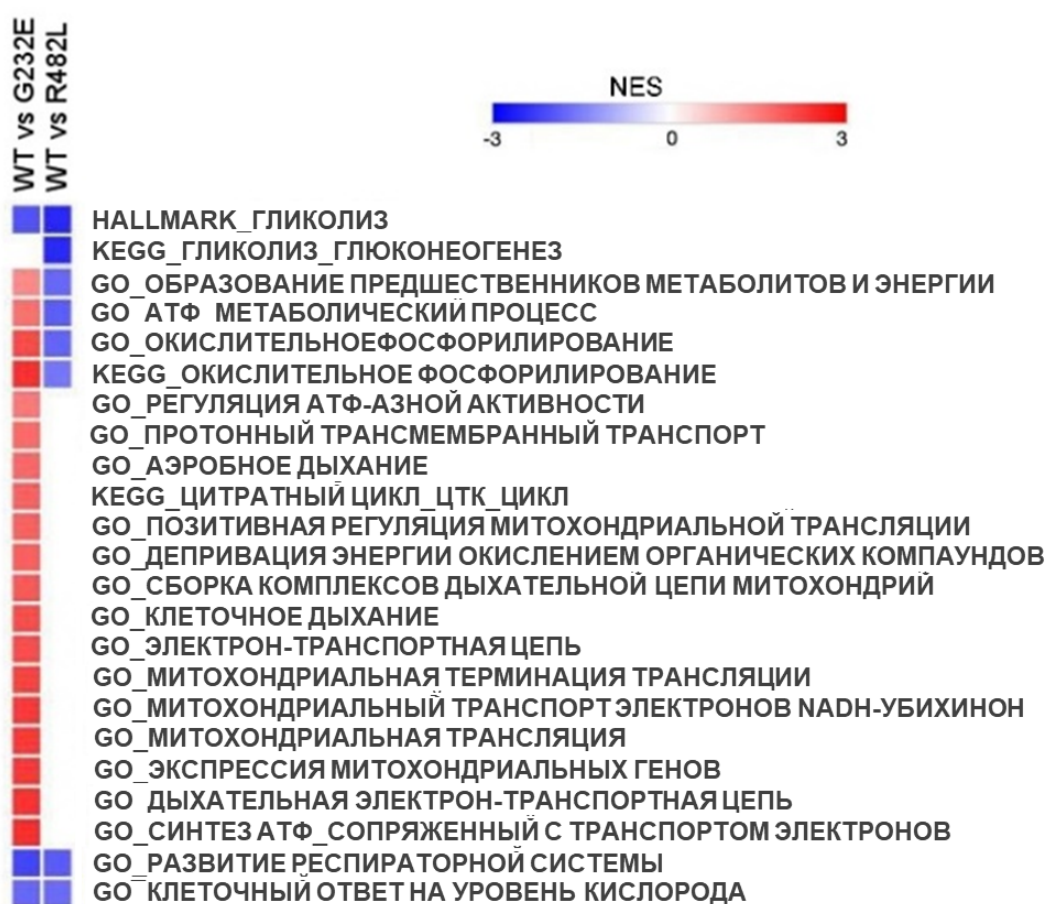


Рисунок 14. Тепловая карта значений NES (нормализованных показателей обогащения) после анализа GSEA представляет метаболические пути с повышенной или пониженной регуляцией в миотрубках G232E/R482L, по сравнению с WT-LMNA; FDR=0,05.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Скелетно-мышечные ламинопатии характеризуются аномальной морфологией ядер, наблюдаемой в биопсиях мышц пациентов [238] и модельных животных [3]; в первичных миобластах [111] и фибробластах пациентов [76], [125], [239], [240], [241]; миогенных клетках-производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов, страдающих скелетно-мышечными ламинопатиями [242]. Подобные аномалии ядер описаны и у миобластов C2C12, экспрессирующих эктопические патогенные *LMNA*-мутации [16], [7], [243], [244], [245], и полученные нами данные относительно влияния мутаций G232E и R482L на морфологию клеточных ядер продолжают этот ряд. Структурные аномалии ядерной ламина, вызванные мутациями *LMNA*, могут способствовать изменению взаимодействия ламинов с хроматином и вызывать серьезные изменения на молекулярном уровне. Так, формирование ядерных агрегатов ламина A/C в фибробластах FPLD-пациентов с мутацией R482L коррелировало со снижением активности РНК-полимеразы II в этих клетках [246].

Скелетно-мышечные нарушения при ламинопатиях отличаются от других нервно-мышечных заболеваний, например, дистрофии Дюшенна, тем, что мутировавший ген экспрессируется не только в мышечных волокнах, но и в сателлитных клетках – резидентных стволовых клетках скелетной мускулатуры. Это приводит к закономерному предположению, что дисфункция сателлитных клеток может способствовать прогрессии *LMNA*-ассоциированных мышечных дистрофий, нарушая регенеративную реакцию в мышечной ткани путем изменения динамики клеточного цикла и постоянных циклов восстановления/регенерации [247]. Тем не менее, экспериментальных данных в подтверждение этой гипотезы получено не так много, и большинство исследований ассоциированных с *LMNA* мышечных дистрофий было нацелено на изучение роли ламина A/C в процессе дифференцировки мышц, но не изменений в здоровом функционировании прогениторных клеток. Недавнее исследование с использованием мышшиной модели EDMD показало, что отсутствие ламина A/C в мышечных стволовых клетках препятствует поддержанию их самообновления, что приводит к истощению пула покоящихся клеток-сателлитов путем нарушения эпигенетической регуляции, в том числе генов контроля клеточного цикла [248].

Ранее мы сообщали о влиянии мутаций *LMNA* на дифференцировку в различных направлениях мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани [215], [216] и миокарда [230]. Мутации ламина A оказывают влияние на плюрипотентные свойства, динамику экспрессии факторов дифференцировки и эффективность дифференцировки специфичным для мутации образом. В результате действия каждой из мутаций *LMNA* формируется определенный

уникальный для нее профиль изменений экспрессии генов, задействованных в регуляции дифференцировки, и это связано со специфическими для мутаций фенотипами.

Наши данные относительно дифференцировки мышечных клеток встают в один ряд с этими наблюдениями и представляют дополнительные доказательства вызванных мутациями *LMNA* изменений в самообновлении пула клеток-предшественников скелетной мускулатуры. Обе мутации – как G232E-*LMNA*, так и R482L-*LMNA* – специфическим образом изменяют профили экспрессии генов и приводят к глобальным нарушениям в координации миогенеза: они вызывают не только снижение способности к пролиферации и спонтанную активацию про-миогенной программы в пролиферирующих миобластах C2C12, но также задержку подавления клеточного цикла после стимуляции миогенеза, что проявляется в нарушении координации поздних стадий дифференцировки миоцитов.

В основе этих явлений могут лежать изменения в формировании ламин-ассоциированных доменов, что было продемонстрировано при полногеномном анализе взаимодействий ламина А с регионами генома во время миогенеза [51]. Различные миссенс-мутации *LMNA* изменяют переходы эухроматин-гетерохроматин при терминальной дифференцировке мышечных клеток. Сбой корректной ассоциации гетерохроматина с ламинной приводит к трем параллельным событиям, которые могут иметь кумулятивный эффект: замедлению выхода из клеточного цикла и из программы плюрипотентности в сочетании с плохо скоординированной индукцией программы терминальной дифференцировки.

Все описанные выше изменения были обнаружены как в мутантной линии G232E-*LMNA*, так и в линии R482L-*LMNA*, и наши данные во многом согласуются со специфическими мышечными фенотипами, связанными с этими мутациями. Например, обнаруженная нами в обеих мутантных линиях задержка в подавлении клеточного цикла может привести к хроническим циклам пролиферации миобластов без включения в растущее миоволокно [247] и иметь результатом дефекты регенерации и мышечную атрофию. Интересно, что, хотя падение коэффициента слияния в R482L было существеннее, чем в G232E, при сравнительном анализе морфологических признаков обнаружилось уменьшение ширины миотрубок и доли крупных миотрубок в культурах G232E, но не в R482L (рисунок 9). Это наблюдение перекликается с сообщениями о мышечном гипертрофическом фенотипе (увеличении мышечной массы и объема, гипертрофии MB I и II типа) у некоторых пациентов с FPLD в присутствии мутаций arg482 *LMNA* [213], [249].

Таким образом, исследование морфологических параметров свидетельствует, что присутствие мутаций G232E и R482L ограничивает потенциал миобластов C2C12 к формированию мультиядерных миотрубок. Этот эффект был ранее продемонстрирован и для мутации R453W-*LMNA* [5], [6], что говорит об общих принципах проявления некоторых

мутаций ламина А. Однако отклонения в морфологии дифференцированных миотрубок специфичны для мутаций, и это позволяет предполагать разные механизмы влияния мутаций на процесс дифференцировки мышечных клеток. Что интересно в сопоставлении с нашими данными, в присутствии мутации R453W-LMNA миобласты C2C12 также должным образом не выходят из клеточного цикла при индукции миогенной дифференцировки, и у них оказывается не полностью заблокирован переход из G1 в S-фазу [5]. В дополнение к этому, эктопическая экспрессия ламина А с мутацией W520S в миобластах C2C12 приводила к уменьшению представленности фосфорилированных изоформ Rb и разрушению его комплекса с LAP2 α [7]. Эти наблюдения относительно других мутаций ламина А согласуются с нашими выводами о нарушении координации механизмов контроля клеточного цикла и дифференцировки при индукции миогенеза в мутантных клеточных моделях.

Биоэнергетические изменения, вызванные мутациями *LMNA* в миобластах, являются еще одним важным открытием в этом исследовании. На несбалансированной клеточной биоэнергетике основываются нарушения энергетического метаболизма ткани в целом, что способствует общей дисфункции скелетной мускулатуры. Поскольку центральная роль в энергетическом метаболизме мышечных клеток принадлежит митохондриям, функциональность и работоспособность скелетных мышц в первую очередь зависят от окислительного метаболизма и функции митохондрий. Накапливается все больше свидетельств того, что митохондриальная дисфункция и aberrантная биоэнергетика вовлечены во многие патологии, влияющие на здоровье скелетной мускулатуры: мышечная дистрофия Дюшенна [250] и другие миопатии/миодистрофии [8], сердечная недостаточность [251], саркопения [252].

Настоящее исследование выявило нарушение функции митохондрий в дифференцированных миотрубках C2C12, несущих мутации G232E и R482L-LMNA. Основываясь на измерениях параметров дыхания, можно сделать вывод, что биоэнергетические профили мутантных моделей отличаются меньшим сопряжением между субстратным окислением и производительностью цепи переноса электронов (рисунок 12E), и, следовательно, митохондриальный энергетический аппарат в них работает с меньшей эффективностью. Учитывая интеграцию метаболических и дифференцировочных путей, которая означает, что метаболические решения могут предшествовать или сопровождать выбор решения о судьбе клетки, возможно предположить, что измененное метаболическое состояние мутантных трансгенных клеток C2C12 взаимосвязано со сдвигами в контроле клеточных программ пролиферации и дифференцировки, наблюдаемыми в наших экспериментах.

Мышечная дифференцировка подчиняется строго упорядоченной, четко определенной во времени последовательности событий, и ключевым из них считается метаболическое переключение с гликолиза на окислительное фосфорилирование, которое необходимо для

обеспечения большого пула АТФ, чтобы удовлетворить энергетические потребности мышц при их сокращении [253]. Одним из подтверждений интеграции метаболической функции и миогенной дифференцировки служит не так давно сделанное открытие, что MyoD, путем взаимодействия с когортой метаболических генов, участвует в контроле митохондриальной функции и является главным регулятором оксидативного метаболизма во взрослых мышцах [254]. Таким образом, дифференцированные скелетно-мышечные клетки опираются на митохондриальное дыхание как основной источник метаболической энергии [205]. Используя соотношение OCR/ECAR в качестве показателя метаболического баланса [255], мы показали, что миотрубки G232E/R482L-LMNA в меньшей степени зависят от окислительного фосфорилирования, по сравнению с WT-LMNA. Мы предполагаем, что неполное метаболическое переключение и измененные митохондриальные биоэнергетические профили вносят вклад в наблюдаемую дисрегуляцию миогенной дифференцировочной программы в наших клеточных моделях ламинопатий. Эти выводы согласуются с результатами исследований мышечных стволовых клеток, обнаруживших, что OXPHOS оказывает непосредственное влияние на контроль их дифференцировки и пролиферативных возможностей [256], [257]. Мышечные сателлитные клетки из дистрофических мышц в мышечной модели МДД демонстрируют митохондриальную дисфункцию, в основном полагаются на гликолиз при производстве энергии, и метаболическое перепрограммирование дистрофических сателлитных клеток *in vitro* в сторону оксидативного метаболизма путем ингибирования гликолиза положительно влияет на их дифференцировочный потенциал [256].

Мутации G232E и R482L-LMNA перепрограммируют митохондриальный биоэнергетический механизм в скелетно-мышечных клетках в противоположных направлениях. Миотрубки R482L-LMNA отчетливо продемонстрировали снижение общей метаболической активности. О подавлении митохондриального метаболизма свидетельствует и наблюдаемое в предыдущих исследованиях аномальное накопление в них липидных капель [214]. Уменьшение показателей максимальной дыхательной способности, резервной емкости митохондрий, эффективности митохондриального сопряжения является показательным индикатором потенциальной митохондриальной дисфункции. Поскольку производство энергии в скелетной мускулатуре крайне зависит от OXPHOS, снижение общей эффективности митохондрий и их резервной дыхательной способности сенситизирует мышечную ткань к риску повреждения и смерти клеток в условиях, когда требуется дополнительная энергия в ответ на стресс или повышенную нагрузку. Известно, что истощение резервной дыхательной способности митохондрий связано с различными патологическими состояниями, включая неадаптивную гипертрофию сердца, нейродегенеративные нарушения и гибель гладкомышечных клеток [258].

Таким образом, утрата как максимальной, так и резервной дыхательной способности, обнаруженная в миотрубках R482L-LMNA, может иметь критическое значение для функционирования скелетно-мышечной ткани, которая служит самым крупным «вкладчиком» в основной метаболический обмен в организме. Важно отметить, что анализ экспрессии генов метаболических путей в миотрубках R482L подтвердил функциональные данные и выявил общее снижение экспрессии генов OXPHOS-системы, регулирующих метаболическую активность клеток. Это наблюдение согласуется с результатами экспрессионного анализа микрочипов [13], который обнаружил понижающую регуляцию генов компонентов комплекса I дыхательной цепи в культивируемых миотрубках, полученных от пациентов с FPLD с мутациями LMNA R482W и R482Q.

Напротив, профили транскриптома миотрубок G232E-LMNA демонстрируют повышенную регуляцию экспрессионных путей, связанных с производством энергии, включая OXPHOS и ЦТК (рисунок 14), что соответствует функциональному биоэнергетическому статусу этой модели. Усиление регуляции митохондриального метаболизма коррелирует с наблюдаемой в этих клетках активацией миогенной программы, которая, при сравнении всех трех линий, наиболее выражена в G232E-LMNA. Однако, несмотря на активацию биоэнергетических профилей, они, как и профили R482L-LMNA, характеризуются сниженными показателями митохондриального сопряжения, что отражает неоптимальную эффективность митохондриального метаболизма в этих клетках. Уменьшение эффективности сопряжения субстратного окисления и образования АТФ, наблюдаемое в мутантных моделях, можно объяснить увеличением фракции утечки протонов в дыхании обеих линий (рисунок 12Д). Утечка протонов – основной механизм, отвечающий за неполную эффективность окислительного фосфорилирования, поскольку этот показатель отражает долю протонов, которые мигрируют в матрикс, минуя АТФ-синтазу и этим снижая генерацию АТФ.

Наряду с выраженным усилением митохондриального OXPHOS, миотрубки линии G232E-LMNA обладают более высоким гликолитическим резервом, чем клетки других модельных линий (рисунок 13В). Это открытие подтверждает, что трансгенная линия с мутацией ламина G232E, в дополнение к усилению АТФ-связанного дыхания, поддерживает неиспользованный резерв гликолитической емкости для быстрой выработки энергии в случае необходимости. Таким образом, по сравнению с R482L-LMNA, G232E-LMNA в целом демонстрирует более высокую резервную метаболическую способность и пластичность, которые могут быть активированы в случае ограничения OXPHOS.

Как функциональные эксперименты, так и анализ транскриптома свидетельствуют о сниженной мощности гликолитического аппарата в мутантных линиях. Это согласуется с результатами уже упомянутого исследования, в котором сообщалось об изменениях

метаболизма глюкозы и подавлении экспрессии некоторых генов гликолиза у FPLD-пациентов с мутациями LMNA R482W/R482Q [13]. Кроме того, наши данные служат подкреплению результатов, полученных при использовании протеомных подходов, которые ранее применялись к клеткам HeLa с экспериментально подавленной экспрессией ламина A/C [9] и фибробластам пациентов с ламинопатиями [12]. Оба эти анализа выявили значительные изменения в экспрессии белков, участвующих в производстве клеточной энергии, включая снижение уровня гликолитических и других метаболических ферментов. Таким образом, можно предположить, что дефект метаболизма глюкозы в скелетных мышцах в целом свойственен проявлению дисфункции ламина A/C.

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, влияют на рост, дифференцировку и метаболизм клеток скелетной мускулатуры. Путем генетической модификации миобластов мышцы C2C12 лентивирусными конструкциями, несущими ген *LMNA* человека дикого типа и мутации R482L/G232E, связанные с семейной частичной липодистрофией типа Даннигана и фенотипом мышечной дистрофии, соответственно, была получена экспериментальная клеточная модель скелетно-мышечных ламинопатий и на ее основе проведено исследование изменений свойств мышечных клеток в присутствии мутаций ламина А.

С использованием модели впервые продемонстрировано, что обе мутации – как G232E, так и R482L – нарушают скоординированную регуляцию путей, контролирующих 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 патологий мышечной ткани, обусловленных мутациями гена *LMNA*.

Дифференцировка мышечных клеток включает в себя существенное перепрограммирование генетических экспрессионных профилей, сопровождающееся изменением формы и состояния клеток. Проведенное исследование показало, что 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 контрактивных 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 представления 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.

Как известно, ключевая роль в определении клеточной идентичности и ее изменений в патологиях принадлежит транскрипционной программе. Контроль транскрипционной программы опосредуется генетическими и эпигенетическими механизмами, взаимосвязанными и действующими в совокупности. Это а) транскрипционные факторы, регулирующие определенный набор генов; б) метилирование ДНК и посттрансляционные модификации гистонов; в) организация хроматина в структуры высшего порядка, основную роль в которой играет ядерная ламина. В настоящее время ни для одного клеточного типа мы не представляем комплексной 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 ламины, клеточного метаболизма и функционирования митохондрий. Вероятно, в изменениях дифференциальной экспрессии генов, имеющих проявление в нарушениях дифференцировки и метаболизма мышечных клеток в присутствии мутаций ламина, задействованы эпигенетические механизмы, как, например, активирующие и репрессирующие модификации гистонов и изменения в ассоциации определенных участков хроматина с ядерной ламинной вследствие мутаций ламина А. Сопоставление изменений в транскриптом 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 нарушения биоэнергетики мышечных клеток. В совокупности наши данные доказывают изменения митохондриальной и гликолитической активности в клеточных моделях G232E/R482L-LMNA, которые свидетельствуют об ухудшении их биоэнергетического здоровья. Скелетная мускулатура является важнейшим метаболическим органом, уникальным в отношении

энергетического обмена. В связи с этим метаболизм является ключевой системой, поражаемой при скелетно-мышечных расстройствах, и аберрации клеточной биоэнергетики (как, например, митохондриальная дисфункция) и метаболического баланса представляют определяющее патогенетическое звено при развитии заболеваний, затрагивающих мышечную ткань. В дополнение к этому, скелетная мускулатура составляет до половины массы тела, и ее можно считать основным детерминантом общего субстратного метаболизма, ответственным за энергетический гомеостаз всего организма. Так, скелетные мышцы являются первоочередным местом утилизации и хранения глюкозы, поэтому разбалансировка гликолитической системы мышечной клетки может приводить к нарушению гомеостаза глюкозы в организме в целом. В связи с этим, 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.

В настоящем исследовании впервые показано, что мутации ламина А по-разному влияют на митохондриальную биоэнергетику дифференцированных мышечных клеток. В присутствии мутации R482L-LMNA дифференцированные миотрубки продемонстрировали сниженный метаболический потенциал. В подтверждение функциональных данных, анализ транскриптомов в этих клетках выявил общее снижение экспрессии генов OXPHOS, которые регулируют метаболическую активность клеток. Напротив, мутация G232E-LMNA перепрограммирует клеточный биоэнергетический аппарат в направлении усиления его работы, и функциональное изменение метаболического фенотипа также согласуется с повышенной регуляцией 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.

Таким образом, в результате проведенного исследования получены доказательства нарушения метаболического и энергетического баланса в мышечных клетках в результате действия мутаций в гене *LMNA*. Обнаруженные 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. Несколько недавних исследований доказательно продемонстрировали, что восстановление биоэнергетической функции митохондрий благотворно влияет на энергетический гомеостаз и функционирование мышц в животных моделях МДД [259], [260] и саркопении [261].

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. Кроме того, охарактеризованные клеточные модели предоставляют возможность использовать их для поиска и тестирования лекарственных препаратов *in vitro*. В целом, результаты исследования относительно влияния мутаций ламина А на свойства мышечных клеток демонстрируют перспективность дальнейшего использования полученных клеточных моделей для изучения механизмов экспрессионной регуляции и их изменений, лежащих в основе ламинопатий и их фенотипических проявлений.

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 ламина А G232E 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 ламинны, согласуются с изменениями в экспрессии генов соответствующих метаболических путей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены

МВ – мышечные волокна

МДД – мышечная дистрофия Дюшенна

ПФ – промежуточные филаменты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТФ – транскрипционные факторы

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

ЯО – ядерная оболочка

ЯПК – ядерные поровые комплексы

ECAR (extracellular acidification rate) – скорость внеклеточного закисления среды

EDMD (Emery-Dreifuss muscular dystrophy) – мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса

FDR (false discovery rate) – частота ложных открытий

FPLD2 (familial partial lipodystrophy type 2) – семейная частичная липодистрофия Даннигана

GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) – анализ обогащения набора генов

LAD (lamin-associated domains) – ламин-ассоциированные домены

LGMD (limb-girdle muscular dystrophy) - поясно-конечностная мышечная дистрофия

MRF (myogenic regulatory factors) – миогенные регуляторные факторы

NES (normalized enrichment score) – нормализованные оценки обогащения

NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерной локализации

OCR (oxygen consumption rate) – скорость потребления кислорода

OXPPOS – окислительное фосфорилирование

SEM (standard error mean) – стандартная ошибка среднего

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bertrand A.T. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies / Bertrand A.T., Chikhaoui K., Yaou R. Ben, Bonne G. // *Biochemical Society transactions* – 2011. – Vol. 39 – № 6 – P.1687–1692.
2. Frock R.L. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation / Frock R.L., Kudlow B.A., Evans A.M., Jameson S.A., Hauschka S.D., Kennedy B.K. // *Genes & Development* – 2006. – Vol. 20 – № 4 – P.486.
3. Gnocchi V.F. Uncoordinated transcription and compromised muscle function in the Lmna-null mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy / Gnocchi V.F., Scharner J., Huang Z., Brady K., Lee J.S., White R.B., Morgan J.E., Sun Y.B., Ellis J.A., Zammit P.S. // *PLOS ONE* – 2011. – Vol. 6 – № 2 – P.1–12.
4. Cohen T. V. Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of *Lap2 α* / Cohen T. V., Gnocchi V.F., Cohen J.E., Aditi P., Liu H., Ellis J.A., Foisner R., Stewart C.L., Zammit P.S., Partridge T.A. // *Human Molecular Genetics* – 2013. – Vol. 22 – № 14 – P.2852–2869.
5. Favreau C. Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts / Favreau C., Higuete D., Courvalin J.-C., Buendia B. // *Molecular and Cellular Biology* – 2004. – Vol. 24 – № 4 – P.1481–1492.
6. Håkelién A.M. Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects / Håkelién A.M., Delbarre E., Gaustad K.G., Buendia B., Collas P. // *Experimental Cell Research* – 2008. – Vol. 314 – № 8 – P.1869–1880.
7. Markiewicz E. Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro / Markiewicz E., Ledran M., Hutchison C.J. // *Journal of Cell Science* – 2005. – Vol. 118 – № 2 – P.409–420.
8. 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.
9. Chen S. Reduced expression of lamin A/C results in modified cell signaling and metabolism coupled with changes in expression of structural proteins / Chen S., Martin C., Maya-Mendoza A., Tang C.W., Lovrić J., Sims P.F.G., Jackson D.A. // *Journal of proteome research* – 2009. – Vol. 8 – № 11 – P.5196–5211.
10. Caron M. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease

- inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence / Caron M., Auclair M., Donadille B., Béréziat V., Guerci B., Laville M., Narbonne H., Bodemer C., Lascols O., Capeau J., Vigouroux C. // *Cell death and differentiation* – 2007. – Vol. 14 – № 10 – P.1759–1767.
11. Sieprath T. Sustained accumulation of prelamin A and depletion of lamin A/C both cause oxidative stress and mitochondrial dysfunction but induce different cell fates / Sieprath T., Corne T.D.J., Nootboom M., Grootaert C., Rajkovic A., Buyschaert B., Robijns J., Broers J.L.V., Ramaekers F.C.S., Koopman W.J.H., Willems P.H.G.M., Vos W.H. de // *Nucleus (Austin, Tex.)* – 2015. – Vol. 6 – № 3 – P.236–246.
 12. Magagnotti C. Protein profiling reveals energy metabolism and cytoskeletal protein alterations in LMNA mutation carriers / Magagnotti C., Bachi A., Zerbini G., Fattore E., Fermo I., Riba M., Previtali S.C., Ferrari M., Andolfo A., Benedetti S. // *Biochimica et biophysica acta* – 2012. – Vol. 1822 – № 6 – P.970–979.
 13. Boschmann M. LMNA mutations, skeletal muscle lipid metabolism, and insulin resistance / Boschmann M., Engeli S., Moro C., Luedtke A., Adams F., Gorzelnik K., Rahn G., Mähler A., Dobberstein K., Krüger A., Schmidt S., Spuler S., Luft F.C., Smith S.R., Schmidt H.H.J., Jordan J. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* – 2010. – Vol. 95 – № 4 – P.1634–1643.
 14. Chaturvedi P. Lamin A Rod Domain Mutants Target Heterochromatin Protein 1 α and β for Proteasomal Degradation by Activation of F-Box Protein, FBXW10 / Chaturvedi P., Parnaik V.K. // *PLOS ONE* – 2010. – Vol. 5 – № 5 – e10620.
 15. Manju K. Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci / Manju K., Muralikrishna B., Parnaik V.K. // *Journal of cell science* – 2006. – Vol. 119 – № Pt 13 – P.2704–2714.
 16. Östlund C. Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy / Östlund C., Bonne G., Schwartz K., Worman H.J. // *Journal of Cell Science* – 2001. – Vol. 114 – № 24 – P.4435–4445.
 17. Vahabikashi A. Nuclear lamins: Structure and function in mechanobiology / Vahabikashi A., Adam S.A., Medalia O., Goldman R.D. // *APL Bioengineering* – 2022. – Vol. 6 – № 1 – P.011503.
 18. Simon D.N. Partners and post-translational modifications of nuclear lamins / Simon D.N., Wilson K.L. // *Chromosoma* – 2013. – Vol. 122 – № 1 – P.13–31.
 19. Heitlinger E. The role of the head and tail domain in lamin structure and assembly: analysis of bacterially expressed chicken lamin A and truncated B2 lamins / Heitlinger E., Peter M., Lustig A., Villiger W., Nigg E.A., Aebi U. // *Journal of structural biology* – 1992. – Vol. 108 – № 1 –

- P.74–91.
20. Shimi T. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription / Shimi T., Pflieger K., Kojima S.I., Pack C.G., Solovei I., Goldman A.E., Adam S.A., Shumaker D.K., Kinjo M., Cremer T., Goldman R.D. // *Genes & Development* – 2008. – Vol. 22 – № 24 – P.3409.
 21. Lammerding J. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction / Lammerding J., Schulze P.C., Takahashi T., Kozlov S., Sullivan T., Kamm R.D., Stewart C.L., Lee R.T. // *The Journal of clinical investigation* – 2004. – Vol. 113 – № 3 – P.370–378.
 22. Houben F. Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength / Houben F., Ramaekers F.C.S., Snoeckx L.H.E.H., Broers J.L.V. // *Biochimica et biophysica acta* – 2007. – Vol. 1773 – № 5 – P.675–686.
 23. Dahl K.N. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber / Dahl K.N., Kahn S.M., Wilson K.L., Discher D.E. // *Journal of cell science* – 2004. – Vol. 117 – № Pt 20 – P.4779–4786.
 24. Wintner O. A Unified Linear Viscoelastic Model of the Cell Nucleus Defines the Mechanical Contributions of Lamins and Chromatin / Wintner O., Hirsch-Attas N., Schlossberg M., Brofman F., Friedman R., Kupervaser M., Kitsberg D., Buxboim A. // *Advanced Science* – 2020. – Vol. 7 – № 8 – P.1901222.
 25. Lammerding J. Lamins a and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics / Lammerding J., Fong L.G., Ji J.Y., Reue K., Stewart C.L., Young S.G., Lee R.T. // *Journal of Biological Chemistry* – 2006. – Vol. 281 – № 35 – P.25768–25780.
 26. Pajerowski J.D. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation / Pajerowski J.D., Dahl K.N., Zhong F.L., Sammak P.J., Discher D.E. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2007. – Vol. 104 – № 40 – P.15619–15624.
 27. Stephens A.D. Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus / Stephens A.D., Banigan E.J., Adam S.A., Goldman R.D., Marko J.F. // *Molecular Biology of the Cell* – 2017. – Vol. 28 – № 14 – P.1984.
 28. Swift J. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation / Swift J., Ivanovska I.L., Buxboim A., Harada T., Dingal P.C.D.P., Pinter J., Pajerowski J.D., Spinler K.R., Shin J.W., Tewari M., Rehfeldt F., Speicher D.W., Discher D.E. // *Science (New York, N.Y.)* – 2013. – Vol. 341 – № 6149 – P.1240104.
 29. Swift J. The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue / Swift J., Discher D.E. // *Journal of cell science* – 2014. – Vol. 127 – № Pt 14 – P.3005–3015.
 30. Broers J.L.V. Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-

- cytoskeletal integrity: Implications for the development of laminopathies / Broers J.L.V., Peeters E.A.G., Kuijpers H.J.H., Endert J., Bouten C.V.C., Oomens C.W.J., Baaijens F.P.T., Ramaekers F.C.S. // *Human Molecular Genetics* – 2004. – Vol. 13 – № 21 – P.2567–2580.
31. Wilson K.L. Lamin-binding Proteins / Wilson K.L., Foisner R. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* – 2010. – Vol. 2 – № 4 – P.554–555.
 32. Lee J.S.H. Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration / Lee J.S.H., Hale C.M., Panorchan P., Khatau S.B., George J.P., Tseng Y., Stewart C.L., Hodzic D., Wirtz D. // *Biophysical journal* – 2007. – Vol. 93 – № 7 – P.2542–2552.
 33. Schwartz C. Lamins and nesprin-1 mediate inside-out mechanical coupling in muscle cell precursors through FHOD1 / Schwartz C., Fischer M., Mamchaoui K., Bigot A., Lok T., Verdier C., Duperray A., Michel R., Holt I., Voit T., Quijano-Roy S., Bonne G., Coirault C. // *Scientific Reports* – 2017. – Vol. 7 – № 1 – P.1253.
 34. Kirby T.J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor / Kirby T.J., Lammerding J. // *Nature cell biology* – 2018. – Vol. 20 – № 4 – P.373.
 35. Jabre S. Nuclear Mechanotransduction in Skeletal Muscle / Jabre S., Hleihel W., Coirault C. // *Cells* – 2021. – Vol. 10 – № 2 – P.1–18.
 36. Kittisopikul M. Computational analyses reveal spatial relationships between nuclear pore complexes and specific lamins / Kittisopikul M., Shimi T., Tatli M., Tran J.R., Zheng Y., Medalia O., Jaqaman K., Adam S.A., Goldman R.D. // *Journal of Cell Biology* – 2021. – Vol. 220 – № 4 – e202007082.
 37. Guelen L. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions / Guelen L., Pagie L., Brassat E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., Klein A. De, Wessels L., Laat W. De, Steensel B. Van // *Nature* – 2008. – Vol. 453 – № 7197 – P.948–951.
 38. Pascual-Reguant L. Lamin B1 mapping reveals the existence of dynamic and functional euchromatin lamin B1 domains / Pascual-Reguant L., Blanco E., Galan S., Dily F. Le, Cuartero Y., Serra-Bardenys G., Carlo V. Di, Iturbide A., Cebrià-Costa J.P., Nonell L., Herreros A.G. de, Croce L. Di, Marti-Renom M.A., Peiró S. // *Nature Communications* – 2018. – Vol. 9 – № 1 – P.3420.
 39. Meuleman W. Constitutive nuclear lamina–genome interactions are highly conserved and associated with A/T-rich sequence / Meuleman W., Peric-Hupkes D., Kind J., Beaudry J.B., Pagie L., Kellis M., Reinders M., Wessels L., Steensel B. Van // *Genome Research* – 2013. – Vol. 23 – № 2 – P.270.
 40. Reddy K.L. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina / Reddy K.L., Zullo J.M., Bertolino E., Singh H. // *Nature* – 2008. – Vol. 452 – № 7184 –

P.243–247.

41. Towbin B.D. Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery / Towbin B.D., González-Aguilera C., Sack R., Gaidatzis D., Kalck V., Meister P., Askjaer P., Gasser S.M. // *Cell* – 2012. – Vol. 150 – № 5 – P.934–947.
42. Solovei I. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation / Solovei I., Wang A.S., Thanisch K., Schmidt C.S., Krebs S., Zwerger M., Cohen T. V., Devys D., Foisner R., Peichl L., Herrmann H., Blum H., Engelkamp D., Stewart C.L., Leonhardt H., Joffe B. // *Cell* – 2013. – Vol. 152 – № 3 – P.584–598.
43. Shaklai S. Gene silencing at the nuclear periphery / Shaklai S., Amariglio N., Rechavi G., Simon A.J. // *The FEBS journal* – 2007. – Vol. 274 – № 6 – P.1383–1392.
44. Zullo J.M. DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina / Zullo J.M., Demarco I.A., Piqué-Regi R., Gaffney D.J., Epstein C.B., Spooner C.J., Luperchio T.R., Bernstein B.E., Pritchard J.K., Reddy K.L., Singh H. // *Cell* – 2012. – Vol. 149 – № 7 – P.1474–1487.
45. Finlan L.E. Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells / Finlan L.E., Sproul D., Thomson I., Boyle S., Kerr E., Perry P., Ylstra B., Chubb J.R., Bickmore W.A. // *PLoS Genetics* – 2008. – Vol. 4 – № 3 – e1000039.
46. Kumaran R.I. A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence / Kumaran R.I., Spector D.L. // *Journal of Cell Biology* – 2008. – Vol. 180 – № 1 – P.51–65.
47. Luderus M.E.E. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. / Luderus M.E.E., Blaauwen J.L. Den, Smit O.J.B. De, Compton D.A., Driel' R. Van, Luderus M.E.E., Graaf A. De, Mattia E., Blaauwen J.L. Den, Grande M.A., Jong L. De, Driel R. Van // *Molecular and Cellular Biology* – 1994. – Vol. 14 – № 9 – P.6297.
48. Zhao K. Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state / Zhao K., Harel A., Stuurman N., Guedalia D., Gruenbaum Y. // *FEBS letters* – 1996. – Vol. 380 – № 1–2 – P.161–164.
49. Mattout A. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes / Mattout A., Goldberg M., Tzur Y., Margalit A., Gruenbaum Y. // *Journal of cell science* – 2007. – Vol. 120 – № Pt 1 – P.77–85.
50. Gay S. Nuclear envelope and chromatin, lock and key of genome integrity / Gay S., Foiani M. // *International review of cell and molecular biology* – 2015. – Vol. 317 – P.267–330.
51. Perovanovic J. Laminopathies disrupt epigenomic developmental programs and cell fate /

- Perovanovic J., Dell'Orso S., Gnochchi V.F., Jaiswal J.K., Sartorelli V., Vigouroux C., Mamchaoui K., Mouly V., Bonne G., Hoffman E.P. // *Science Translational Medicine* – 2016. – Vol. 8 – № 335 – P.335ra58.
52. Wen B. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells / Wen B., Wu H., Shinkai Y., Irizarry R.A., Feinberg A.P. // *Nature Genetics* – 2009. – Vol. 41 – № 2 – P.246–250.
 53. Croft J.A. Differences in the Localization and Morphology of Chromosomes in the Human Nucleus / Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A. // *The Journal of Cell Biology* – 1999. – Vol. 145 – № 6 – P.1119.
 54. Lund E.G. Distinct features of lamin A-interacting chromatin domains mapped by Chip-sequencing from sonicated or micrococcal nuclease-digested chromatin / Lund E.G., Duband-Goulet I., Oldenburg A., Buendia B., Collas P. // *Nucleus* – 2015. – Vol. 6 – № 1 – P.30–39.
 55. Gesson K. A-type lamins bind both hetero- and euchromatin, the latter being regulated by lamina-associated polypeptide 2 alpha / Gesson K., Rescheneder P., Skoruppa M.P., Haeseler A. Von, Dechat T., Foisner R. // *Genome Research* – 2016. – Vol. 26 – № 4 – P.462.
 56. Bronshtein I. Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior / Bronshtein I., Kepten E., Kanter I., Berezin S., Lindner M., Redwood A.B., Mai S., Gonzalo S., Foisner R., Shav-Tal Y., Garini Y. // *Nature Communications* – 2015. – Vol. 6 – P.8044.
 57. Andrés V. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization // *J. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 187. – № 7. – P.945–957.
 58. Dechat T. Lamina-Independent Lamins in the Nuclear Interior Serve Important Functions / Dechat T., Gesson K., Foisner R. // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* – 2010. – Vol. 75 – P.533–543.
 59. Markiewicz E. Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein / Markiewicz E., Dechat T., Foisner R., Quinlan R.A., Hutchison C.J. // *Molecular biology of the cell* – 2002. – Vol. 13 – № 12 – P.4401–4413.
 60. Naetar N. Lamin complexes in the nuclear interior control progenitor cell proliferation and tissue homeostasis / Naetar N., Foisner R. // *Cell Cycle* – 2009. – Vol. 8 – № 10 – P.1488–1493.
 61. Kumaran R.I. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription / Kumaran R.I., Muralikrishna B., Parnaik V.K. // *The Journal of cell biology* – 2002. – Vol. 159 – № 5 – P.783–793.
 62. Spann T.P. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription / Spann T.P., Goldman A.E., Wang C., Huang S., Goldman R.D. // *The Journal of cell biology* – 2002. – Vol. 156 – № 4 – P.603–608.
 63. Dechat T. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the

- nucleus and chromatin / Dechat T., Pflieger K., Sengupta K., Shimi T., Shumaker D.K., Solimando L., Goldman R.D. // *Genes & Development* – 2008. – Vol. 22 – № 7 – P.832.
64. Gonzalez-Suarez I. Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway / Gonzalez-Suarez I., Redwood A.B., Perkins S.M., Vermolen B., Lichtensztejn D., Grotsky D.A., Morgado-Palacin L., Gapud E.J., Sleckman B.P., Sullivan T., Sage J., Stewart C.L., Mai S., Gonzalo S. // *The EMBO Journal* – 2009. – Vol. 28 – № 16 – P.2414.
65. Redwood A.B. A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair / Redwood A.B., Perkins S.M., Vanderwaal R.P., Feng Z., Biehl K.J., Gonzalez-Suarez I., Morgado-Palacin L., Shi W., Sage J., Roti-Roti J.L., Stewart C.L., Zhang J., Gonzalo S. // *Cell Cycle* – 2011. – Vol. 10 – № 15 – P.2549.
66. Gonzalo S. DNA Damage and Lamins / Gonzalo S. // *Advances in experimental medicine and biology* – 2014. – Vol. 773 – P.377-99.
67. Moir R.D. Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle-- relationship between structure and function / Moir R.D., Spann T.P., Lopez-Soler R.I., Yoon M., Goldman A.E., Khuon S., Goldman R.D. // *Journal of structural biology* – 2000. – Vol. 129 – № 2–3 – P.324–334.
68. Zastrow M.S. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues / Zastrow M.S., Vlcek S., Wilson K.L. // *Journal of Cell Science* – 2004. – Vol. 117 – № 7 – P.979–987.
69. Ivorra C. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C / Ivorra C., Kubicek M., González J.M., Sanz-González S.M., Álvarez-Barrientos A., O'Connor J.E., Burke B., Andrés V. // *Genes & Development* – 2006. – Vol. 20 – № 3 – P.307.
70. Scaffidi P. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing / Scaffidi P., Misteli T. // *Nature cell biology* – 2008. – Vol. 10 – № 4 – P.452.
71. Vadrot N. The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy / Vadrot N., Duband-Goulet I., Cabet E., Attanda W., Barateau A., Vicart P., Gerbal F., Briand N., Vigouroux C., Oldenburg A.R., Lund E.G., Collas P., Buendia B. // *Human molecular genetics* – 2015. – Vol. 24 – № 7 – P.2096–2109.
72. Osmanagic-Myers S. Lamins at the crossroads of mechanosignaling / Osmanagic-Myers S., Dechat T., Foisner R. // *Genes & Development* – 2015. – Vol. 29 – № 3 – P.225.
73. Kim Y. Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells / Kim Y., Sharov A.A., McDole K., Cheng M., Hao H., Fan C.M., Gaiano N., Ko M.S.H., Zheng Y. // *Science (New York, N.Y.)* – 2011. – Vol. 334 – № 6063 – P.1706–1710.
74. Kim Y. Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells lacking all lamins / Kim Y., Zheng X., Zheng Y. // *Cell Research* – 2013. – Vol. 23 – № 12 – P.1420.

75. Sullivan T. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy / Sullivan T., Escalante-Alcalde D., Bhatt H., Anver M., Bhat N., Nagashima K., Stewart C.L., Burke B. // *The Journal of cell biology* – 1999. – Vol. 147 – № 5 – P.913–919.
76. Muchir A. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene / Muchir A., Engelen B.G. Van, Lammens M., Mislow J.M., McNally E., Schwartz K., Bonne G. // *Experimental cell research* – 2003. – Vol. 291 – № 2 – P.352–362.
77. Nikolova V. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice / Nikolova V., Leimena C., McMahon A.C., Tan J.C., Chandar S., Jogia D., Kesteven S.H., Michalicek J., Otway R., Verheyen F., Rainer S., Stewart C.L., Martin D., Feneley M.P., Fatkin D. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2004. – Vol. 113 – № 3 – P.357–369.
78. Engelen B.G.M. Van The lethal phenotype of a homozygous nonsense mutation in the lamin A/C gene / Engelen B.G.M. Van, Muchir A., Hutchison C.J., Kooi A.J. Van Der, Bonne G., Lammens M. // *Neurology* – 2005. – Vol. 64 – № 2 – P.374–376.
79. Padiath Q.S. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy / Padiath Q.S., Saigoh K., Schiffmann R., Asahara H., Yamada T., Koeppen A., Hogan K., Ptáček L.J., Fu Y.H. // *Nature Genetics* – 2006. – Vol. 38 – № 10 – P.1114–1123.
80. Parry D.A. Heterozygous lamin B1 and lamin B2 variants cause primary microcephaly and define a novel laminopathy / Parry D.A., Martin C.A., Greene P., Jackson A.P. // *Genetics in Medicine* – 2020. – Vol. 23 – № 2 – P.408–414.
81. Damiano J.A. Mutation of the nuclear lamin gene LMNB2 in progressive myoclonus epilepsy with early ataxia / Damiano J.A., Afawi Z., Bahlo M., Mauermann M., Misk A., Arsov T., Oliver K.L., Dahl H.H.M., Eliot Shearer A., Smith R.J.H., Hall N.E., Mahmood K., Leventer R.J., Scheffer I.E., Muona M., Lehesjoki A.E., Korczyn A.D., Herrmann H., Berkovic S.F., Hildebrand M.S. // *Human Molecular Genetics* – 2015. – Vol. 24 – № 16 – P.4483.
82. Valilou S.F. A novel biallelic LMNB2 variant in a patient with progressive myoclonus epilepsy and ataxia: A case of laminopathy / Valilou S.F., Hagh J.K., Asl M.S., Rad I.A., Edizadeh M., Pooladi A. // *Clinical Case Reports* – 2021. – Vol. 9 – № 8 – e04520.
83. Soleimanipour F. A novel missense variant in the LMNB2 gene causes progressive myoclonus epilepsy / Soleimanipour F., Razmara E., Rahbarizadeh F., Fallahi E., Khodaeian M., Tavasoli A.R., Garshasbi M. // *Acta neurologica Belgica* – 2021. – Vol. 122 – №3 – P.659-667.
84. Hegele R.A. Sequencing of the Reannotated LMNB2 Gene Reveals Novel Mutations in Patients with Acquired Partial Lipodystrophy / Hegele R.A., Cao H., Liu D.M., Costain G.A.,

- Charlton-Menys V., Wilson Rodger N., Durrington P.N. // *The American Journal of Human Genetics* – 2006. – Vol. 79 – № 2 – P.383–389.
85. Vergnes L. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity / Vergnes L., Péterfy M., Bergo M.O., Young S.G., Reue K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2004. – Vol. 101 – № 28 – P.10428-33.
86. Coffinier C. Abnormal development of the cerebral cortex and cerebellum in the setting of lamin B2 deficiency / Coffinier C., Chang S.Y., Nobumori C., Tu Y., Farber E.A., Toth J.I., Fong L.G., Young S.G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2010. – Vol. 107 – № 11 – P.5076–5081.
87. Coffinier C. Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons / Coffinier C., Jung H.J., Nobumori C., Chang S., Tu Y., Barnes R.H., Yoshinaga Y., Jong P.J. De, Vergnes L., Reue K., Fong L.G., Young S.G. // *Molecular biology of the cell* – 2011. – Vol. 22 – № 23 – P.4683–4693.
88. Harborth J. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs / Harborth J., Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T., Weber K. // *Journal of cell science* – 2001. – Vol. 114 – № Pt 24 – P.4557–4565.
89. Lin F. Structural Organization of the Human Gene Encoding Nuclear Lamin A and Nuclear Lamin C / Lin F., Worman H.J. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1993. – Vol. 268 – № 22 – P.16321–16326.
90. Ho R. Complex effects of laminopathy mutations on nuclear structure and function / Ho R., Hegele R.A. // *Clinical genetics* – 2019. – Vol. 95 – № 2 – P.199–209.
91. Bonne G. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy / Bonne G., Barletta M.R. Di, Varnous S., Bécane H.M., Hammouda E.H., Merlini L., Muntoni F., Greenberg C.R., Gary F., Urtizbera J.A., Duboc D., Fardeau M., Toniolo D., Schwartz K. // *Nature genetics* – 1999. – Vol. 21 – № 3 – P.285–288.
92. Zaremba-Czogalla M. Laminopathies: The molecular background of the disease and the prospects for its treatment / M. Zaremba-Czogalla, M. Dubińska-Magiera, R. Rzepecki // *Cellular and Molecular Biology Letters* – 2011.– Vol. 16 – №1 – P.114–148.
93. Worman H.J. Nuclear lamins and laminopathies / Worman H.J. // *The Journal of pathology* – 2012. – Vol. 226 – № 2 – P.316.
94. Varela I. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging / Varela I., Pereira S., Ugalde A.P., Navarro C.L., Suárez M.F., Cau P., Cadiñanos J., Osorio F.G., Foray N., Cobo J., Carlos F. De, Lévy N., Freije J.M.P., López-Otín C. // *Nature medicine* – 2008. – Vol. 14 – № 7 – P.767–772.
95. Benedetti S. Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and

- peripheral neuropathy / Benedetti S., Bertini E., Iannaccone S., Angelini C., Trisciani M., Toniolo D., Sferrazza B., Carrera P., Comi G., Ferrari M., Quattrini A., Previtali S.C. // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* – 2005. – Vol. 76 – № 7 – P.1019.
96. Maggi L. LMNA-associated myopathies: the Italian experience in a large cohort of patients / Maggi L., D'Amico A., Pini A., Sivo S., Pane M., Ricci G., Vercelli L., D'Ambrosio P., Travaglini L., Sala S., Brenna G., Kapetis D., Scarlato M., Pegoraro E., Ferrari M., Toscano A., Benedetti S., Bernasconi P., Colleoni L., Lattanzi G., Bertini E., Mercuri E., Siciliano G., Rodolico C., Mongini T., Politano L., Previtali S.C., Carboni N., Mantegazza R., Morandi L. // *Neurology* – 2014. – Vol. 83 – № 18 – P.1634–1644.
97. Osmanagic-Myers S. The structural and gene expression hypotheses in laminopathic diseases— not so different after all / Osmanagic-Myers S., Foisner R. // *Molecular Biology of the Cell* – 2019. – Vol. 30 – № 15 – P.1786.
98. Carmosino M. Role of nuclear Lamin A/C in cardiomyocyte functions / Carmosino M., Torretta S., Procino G., Gerbino A., Forleo C., Favale S., Svelto M. // *Biology of the Cell* – 2014. – Vol. 106 – № 10 – P.346–358.
99. Davidson P.M. Broken nuclei – lamins, nuclear mechanics and disease / Davidson P.M., Lammerding J. // *Trends in cell biology* – 2014. – Vol. 24 – № 4 – P.247.
100. Gerbino A. Role of Lamin A/C Gene Mutations in the signaling defects leading to cardiomyopathies / Gerbino A., Procino G., Svelto M., Carmosino M. // *Frontiers in Physiology* – 2018. – Vol. 9 – № SEP – P.1356.
101. Miroshnikova Y.A. Emerging roles of mechanical forces in chromatin regulation / Miroshnikova Y.A., Nava M.M., Wickström S.A. // *Journal of Cell Science* – 2017. – Vol. 130 – № 14 – P.2243–2250.
102. Gerace L. Messages from the voices within: regulation of signaling by proteins of the nuclear lamina / Gerace L., Tapia O. // *Current Opinion in Cell Biology* – 2018. – Vol. 52 – P.14–21.
103. Emerson L.J. Defects in cell spreading and ERK1/2 activation in fibroblasts with lamin A/C mutations / Emerson L.J., Holt M.R., Wheeler M.A., Wehnert M., Parsons M., Ellis J.A. // *Biochimica et biophysica acta* – 2009. – Vol. 1792 – № 8 – P.810–821.
104. Muchir A. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins / Muchir A., Shan J., Bonne G., Lehnart S.E., Worman H.J. // *Human Molecular Genetics* – 2009. – Vol. 18 – № 2 – P.241.
105. Muchir A. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling has beneficial effects on skeletal muscle in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutation / Muchir A., Kim Y.J., Reilly S.A., Wu W., Choi J.C., Worman H.J. //

- Skeletal Muscle – 2013. – Vol. 3 – № 1 – P.1.
106. Vignier N. The non-muscle ADF/cofilin-1 controls sarcomeric actin filament integrity and force production in striated muscle laminopathies / Vignier N., Chatzifrangkeskou M., Pinton L., Wioland H., Marais T., Lemaitre M., Dour C. Le, Peccate C., Cardoso D., Schmitt A., Wu W., Biferi M.G., Naouar N., Macquart C., Beuvin M., Decostre V., Bonne G., Romet-Lemonne G., Worman H.J., Tedesco F.S., Jégou A., Muchir A. // *Cell Reports* – 2021. – Vol. 36 – № 8 – P.109601.
 107. Ramos F.J. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival / Ramos F.J., Chen S.C., Garelick M.G., Dai D.F., Liao C.Y., Schreiber K.H., MacKay V.L., An E.H., Strong R., Ladiges W.C., Rabinovitch P.S., Kaeberlein M., Kennedy B.K. // *Science Translational Medicine* – 2012. – Vol. 4 – № 144 – P.144ra103-144ra103.
 108. Choi J.C. Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation / Choi J.C., Muchir A., Wu W., Iwata S., Homma S., Morrow J.P., Worman H.J. // *Science translational medicine* – 2012. – Vol. 4 – № 144 – P.144ra102.
 109. Dour C. Le Extracellular matrix remodeling and transforming growth factor- β signaling abnormalities induced by lamin A/C variants that cause lipodystrophy / Dour C. Le, Wu W., Béréziat V., Capeau J., Vigouroux C., Worman H.J. // *Journal of Lipid Research* – 2017. – Vol. 58 – № 1 – P.151.
 110. Janin A. SMAD6 overexpression leads to accelerated myogenic differentiation of LMNA mutated cells / Janin A., Bauer D., Ratti F., Valla C., Bertrand A., Christin E., Chopin E., Streichenberger N., Bonne G., Gache V., Cohen T., Méjat A. // *Scientific Reports* – 2018. – Vol. 8 – № 1 – P.1–15.
 111. Bertrand A.T. Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors / Bertrand A.T., Ziaei S., Ehret C., Duchemin H., Mamchaoui K., Bigot A., Mayer M., Quijano-Roy S., Desguerre I., Lainé J., Yaou R. Ben, Bonne G., Coirault C. // *Journal of Cell Science* – 2014. – Vol. 127 – № 13 – P.2873–2884.
 112. Owens D.J. Lamin Mutations Cause Increased YAP Nuclear Entry in Muscle Stem Cells / Owens D.J., Fischer M., Jabre S., Moog S., Mamchaoui K., Butler-Browne G., Coirault C. // *Cells* – 2020. – Vol. 9 – № 4 – P.816.
 113. Owens D.J. Lamin-Related Congenital Muscular Dystrophy Alters Mechanical Signaling and Skeletal Muscle Growth / Owens D.J., Messéant J., Moog S., Viggars M., Ferry A., Mamchaoui K., Lacène E., Roméro N., Brull A., Bonne G., Butler-Browne G., Coirault C. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2021. – Vol. 22 – № 1 – P.1–22.

114. Lu D. LMNA E82K Mutation Activates FAS and Mitochondrial Pathways of Apoptosis in Heart Tissue Specific Transgenic Mice / Lu D., Lian H., Zhang X., Shao H., Huang L., Qin C., Zhang L. // PLOS ONE – 2010. – Vol. 5 – № 12 – e15167.
115. Worman H.J. Cell signaling abnormalities in cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutations / Worman H.J. // Biochemical Society transactions – 2018. – VOL. 46 – № 1 – P.37.
116. Rajgor D. Multiple Novel Nesprin-1 and Nesprin-2 Variants Act as Versatile Tissue-Specific Intracellular Scaffolds / Rajgor D., Mellad J.A., Autore F., Zhang Q., Shanahan C.M. // PLOS ONE – 2012. – Vol. 7 – № 7 – e40098.
117. Korfali N. The nuclear envelope proteome differs notably between tissues / Korfali N., Wilkie G.S., Swanson S.K., Srsen V., las Heras J. de, Batrakou D.G., Malik P., Zuleger N., Kerr A.R.W., Florens L., Schirmer E.C. // Nucleus – 2012. – Vol. 3 – № 6 – P.552.
118. Duong N.T. Nesprins: Tissue-Specific Expression of Epsilon and Other Short Isoforms / Duong N.T., Morris G.E., Lam L.T., Zhang Q., Sewry C.A., Shanahan C.M., Holt I. // PLOS ONE – 2014. – Vol. 9 – № 4 – e94380.
119. Duband-Goulet I. Subcellular localization of SREBP1 depends on its interaction with the C-terminal region of wild-type and disease related A-type lamins / Duband-Goulet I., Woerner S., Gasparini S., Attanda W., Kondé E., Tellier-Lebègue C., Craescu C.T., Gombault A., Roussel P., Vadrot N., Vicart P., Östlund C., Worman H.J., Zinn-Justin S., Buendia B. // Experimental cell research – 2011. – Vol. 317 – № 20 – P.2800–2813.
120. Buendia B. LMNA p.R482W mutation related to FPLD2 alters SREBP1-A type lamin interactions in human fibroblasts and adipose stem cells / Buendia B. // Orphanet Journal of Rare Diseases – 2015. – Vol. 10 – № 2 – P.1–1.
121. Ho C.Y. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics / Ho C.Y., Jaalouk D.E., Vartiainen M.K., Lammerding J. // Nature – 2013. – Vol. 497 – № 7450 – P.507–513.
122. Ahmady E. Muscle Enriched Lamin Interacting Protein (Mlip) Binds Chromatin and Is Required for Myoblast Differentiation / Ahmady E., Blais A., Burgon P.G. // Cells – 2021. – Vol. 10 – № 3 – P.1–14.
123. Hegele R.A. LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies / Hegele R.A. // Clinical Genetics – 2005. – Vol. 68 – № 1 – P.31–34.
124. Captur G. Lamin mutation location predicts cardiac phenotype severity: combined analysis of the published literature / Captur G., Arbustini E., Syrris P., Radenkovic D., O'Brien B., McKenna W.J., Moon J.C. // Open Heart – 2018. – Vol. 5 – № 2 – e000915.
125. Vigouroux C. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene / Vigouroux C., Auclair M.,

- Dubosclard E., Pouchelet M., Capeau J., Courvalin J.C., Buendia B. // *Journal of Cell Science* – 2001. – Vol. 114 – № 24 – P.4459–4468.
126. Paulsen J. Chrom3D: Three-dimensional genome modeling from Hi-C and nuclear lamin-genome contacts / Paulsen J., Sekelja M., Oldenburg A.R., Barateau A., Briand N., Delbarre E., Shah A., Sørensen A.L., Vigouroux C., Buendia B., Collas P. // *Genome Biology* – 2017. – Vol. 18 – № 1 – P.1–15.
127. Graziano S. Causes and consequences of genomic instability in laminopathies: Replication stress and interferon response / Graziano S., Kreienkamp R., Coll-Bonfill N., Gonzalo S. // *Nucleus* – 2018. – Vol. 9 – № 1 – P.258.
128. Gotzmann J. A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? / Gotzmann J., Foisner R. // *Histochemistry and Cell Biology* – 2005. – Vol. 125 – № 1 – P.33–41.
129. Meshorer E. Gone with the Wnt/Notch: stem cells in laminopathies, progeria, and aging / Meshorer E., Gruenbaum Y. // *Journal of Cell Biology* – 2008. – Vol. 181 – № 1 – P.9–13.
130. Liu B. Genomic instability in laminopathy-based premature aging / Liu B., Wang J., Chan K.M., Tjia W.M., Deng W., Guan X., Huang J.D., Li K.M., Chau P.Y., Chen D.J., Pei D., Pendas A.M., Cadiñanos J., López-Otín C., Tse H.F., Hutchison C., Chen J., Cao Y., Cheah K.S.E., Tryggvason K., Zhou Z. // *Nature medicine* – 2005. – Vol. 11 – № 7 – P.780–785.
131. Cho S. Mechanosensing by the Lamina Protects against Nuclear Rupture, DNA Damage, and Cell-Cycle Arrest / Cho S., Vashisth M., Abbas A., Majkut S., Vogel K., Xia Y., Ivanovska I.L., Irianto J., Tewari M., Zhu K., Tichy E.D., Mourkioti F., Tang H.Y., Greenberg R.A., Prosser B.L., Discher D.E. // *Developmental cell* – 2019. – Vol. 49 – № 6 – P.920- 935.e5.
132. Earle A.J. Mutant lamins cause nuclear envelope rupture and DNA damage in skeletal muscle cells / Earle A.J., Kirby T.J., Fedorchak G.R., Isermann P., Patel J., Iruvanti S., Moore S.A., Bonne G., Wallrath L.L., Lammerding J. // *Nature Materials* – 2019. – Vol. 19 – № 4 – P.464–473.
133. vos W.H. De Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies / vos W.H. De, Houben F., Kamps M., Malhas A., Verheyen F., Cox J., Manders E.M.M., Verstraeten V.L.R.M., steensel M.A.M. Van, Marcelis C.L.M., wijngaard A. Van den, Vaux D.J., Ramaekers F.C.S., Broers J.L.V. // *Human molecular genetics* – 2011. – Vol. 20 – № 21 – P.4175–4186.
134. Lattanzi G. Laminopathies: Many diseases, one gene. Report of the first Italian meeting course on laminopathies / Lattanzi G., Benedetti S., Bertini E., Boriani G., Mazzanti L., Novelli G., Pasquali R., Pini A., Politano L. // *Acta Myologica* – 2011. – Vol. 30 – № OCTOBER – P.138–143.

135. Maggi L. Skeletal Muscle Laminopathies: A Review of Clinical and Molecular Features / Maggi L., Carboni N., Bernasconi P. // *Cells* – 2016. – Vol. 5 – № 3 – P.33.
136. Hah J. Deciphering Nuclear Mechanobiology in Laminopathy / Hah J., Kim D.-H. // *Cells* – 2019. – Vol. 8 – № 3 – P.231.
137. Zwerger M. Myopathic lamin mutations impair nuclear stability in cells and tissue and disrupt nucleo-cytoskeletal coupling / Zwerger M., Jaalouk D.E., Lombardi M.L., Isermann P., Mauermann M., Dialynas G., Herrmann H., Wallrath L., Lammerding J. // *Human Molecular Genetics* – 2013. – Vol. 22 – № 12 – P.2335–2349.
138. Anderson C.L. Most myopathic lamin variants aggregate: a functional genomics approach for assessing variants of uncertain significance / Anderson C.L., Langer E.R., Routes T.C., McWilliams S.F., Bereslavsky I., Kamp T.J., Eckhardt L.L. // *NPJ Genomic Medicine* – 2021. – Vol. 6 – № 1 – P.103.
139. Brosig M. Interfering with the connection between the nucleus and the cytoskeleton affects nuclear rotation, mechanotransduction and myogenesis / Brosig M., Ferralli J., Gelman L., Chiquet M., Chiquet-Ehrismann R. // *The international journal of biochemistry & cell biology* – 2010. – Vol. 42 – № 10 – P.1717–1728.
140. Hale C.M. Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models / Hale C.M., Shrestha A.L., Khatau S.B., Stewart-Hutchinson P.J., Hernandez L., Stewart C.L., Hodzic D., Wirtz D. // *Biophysical Journal* – 2008. – Vol. 95 – № 11 – P.5462–5475.
141. Khatau S.B. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape / Khatau S.B., Hale C.M., Stewart-Hutchinson P.J., Patel M.S., Stewart C.L., Searson P.C., Hodzic D., Wirtz D. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2009. – Vol. 106 – № 45 – P.19017–19022.
142. Lombardi M.L. Keeping the LINC: the importance of nucleo-cytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function / Lombardi M.L., Lammerding J. // *Biochemical Society transactions* – 2011. – Vol. 39 – № 6 – P.1729.
143. Chi Y.H. Reversal of laminopathies: the curious case of SUN1 / Chi Y.H., Chen C.Y., Jeang K.T. // *Nucleus* – 2012. – Vol. 3 – № 5 – P.418.
144. Méjat A. LINC complexes in health and disease / Méjat A., Misteli T. // *Nucleus* – 2010. – Vol. 1 – № 1 – P.40.
145. Schreiber K.H. When lamins go bad: Nuclear structure and disease // *Cell*. – 2013. – Vol. 152. – № 6. – P.1365–1375.
146. Zhang Q. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity / Zhang Q., Bethmann C., Worth N.F.,

- Davies J.D., Wasner C., Feuer A., Ragnauth C.D., Yi Q., Mellad J.A., Warren D.T., Wheeler M.A., Ellis J.A., Skepper J.N., Vorgerd M., Schlotter-Weigel B., Weissberg P.L., Roberts R.G., Wehnert M., Shanahan C.M. // *Human molecular genetics* – 2007. – Vol. 16 – № 23 – P.2816–2833.
147. Attali R. Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogryposis / Attali R., Warwar N., Israel A., Gurt I., McNally E., Puckelwartz M., Glick B., Nevo Y., Ben-Neriah Z., Melki J. // *Human molecular genetics* – 2009. – Vol. 18 – № 18 – P.3462–3469.
148. Fanin M. Dominant muscular dystrophy with a novel SYNE1 gene mutation / Fanin M., Savarese M., Nascimbeni A.C., Fruscio G. Di, Pastorello E., Tasca E., Trevisan C.P., Nigro V., Angelini C. // *Muscle & nerve* – 2015. – Vol. 51 – № 1 – P.145–147.
149. Taranum S. LINC complex alterations in DMD and EDMD/CMT fibroblasts / Taranum S., Vaylann E., Meinke P., Abraham S., Yang L., Neumann S., Karakesisoglou I., Wehnert M., Noegel A.A. // *European Journal of Cell Biology* – 2012. – Vol. 91 – № 8 – P.614.
150. Meinke P. Muscular Dystrophy-Associated SUN1 and SUN2 Variants Disrupt Nuclear-Cytoskeletal Connections and Myonuclear Organization / Meinke P., Mattioli E., Haque F., Antoku S., Columbaro M., Straatman K.R., Worman H.J., Gundersen G.G., Lattanzi G., Wehnert M., Shackleton S. // *PLoS Genetics* – 2014. – Vol. 10 – № 9 – e1004605.
151. Haque F. Mammalian SUN Protein Interaction Networks at the Inner Nuclear Membrane and Their Role in Laminopathy Disease Processes / Haque F., Mazzeo D., Patel J.T., Smallwood D.T., Ellis J.A., Shanahan C.M., Shackleton S. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2010. – Vol. 285 – № 5 – P.3487.
152. Yang L. Mutations in LMNA modulate the lamin A--Nesprin-2 interaction and cause LINC complex alterations / Yang L., Munck M., Swaminathan K., Kapinos L.E., Noegel A.A., Neumann S. // *PloS one* – 2013. – Vol. 8 – № 8 – e71850.
153. Roman W. Nuclear positioning in skeletal muscle / Roman W., Gomes E.R. // *Seminars in Cell & Developmental Biology* – 2018. – Vol. 82 – P.51–56.
154. Méjat A. Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular dystrophy / Méjat A., Decostre V., Li J., Renou L., Kesari A., Hantaï D., Stewart C.L., Xiao X., Hoffman E., Bonne G., Misteli T. // *The Journal of Cell Biology* – 2009. – Vol. 184 – № 1 – P.31.
155. Metzger T. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function / Metzger T., Gache V., Xu M., Cadot B., Folker E.S., Richardson B.E., Gomes E.R., Baylies M.K. // *Nature* – 2012. – Vol. 484 – № 7392 – P.120–124.
156. Zhang X. Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron

- innervation / Zhang X., Xu R., Zhu B., Yang X., Ding X., Duan S., Xu T., Zhuang Y., Han M. // *Development* (Cambridge, England) – 2007. – Vol. 134 – № 5 – P.901–908.
157. Lei K. SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice / Lei K., Zhang X., Ding X., Guo X., Chen M., Zhu B., Xu T., Zhuang Y., Xu R., Han M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2009. – Vol. 106 – № 25 – P.10207.
158. Wilson M.H. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells / Wilson M.H., Holzbaur E.L.F. // *Development* – 2015. – Vol. 142 – № 1 – P.218–228.
159. Stroud M.J. Nesprin 1 α 2 is essential for mouse postnatal viability and nuclear positioning in skeletal muscle / Stroud M.J., Feng W., Zhang J., Veevers J., Fang X., Gerace L., Chen J. // *Journal of Cell Biology* – 2017. – Vol. 216 – № 7 – P.1915–1924.
160. Zhang J. Nesprin 1 is critical for nuclear positioning and anchorage / Zhang J., Felder A., Liu Y., Guo L.T., Lange S., Dalton N.D., Gu Y., Peterson K.L., Mizisin A.P., Shelton G.D., Lieber R.L., Chen J. // *Human Molecular Genetics* – 2010. – Vol. 19 – № 2 – P.329–341.
161. Elhanany-Tamir H. Organelle positioning in muscles requires cooperation between two KASH proteins and microtubules / Elhanany-Tamir H., Yu Y. V., Shnayder M., Jain A., Welte M., Volk T. // *The Journal of Cell Biology* – 2012. – Vol. 198 – № 5 – P.833.
162. Auld A.L. Nucleus-dependent sarcomere assembly is mediated by the LINC complex / Auld A.L., Folker E.S. // *Molecular Biology of the Cell* – 2016. – Vol. 27 – № 15 – P.2351–2359.
163. Mattioli E. Prelamin A-mediated recruitment of SUN1 to the nuclear envelope directs nuclear positioning in human muscle / Mattioli E., Columbaro M., Capanni C., Maraldi N.M., Cenni V., Scotlandi K., Marino M.T., Merlini L., Squarzone S., Lattanzi G. // *Cell Death and Differentiation* – 2011. – Vol. 18 – № 8 – P.1305.
164. Folker E.S. Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement / Folker E.S., Östlund C., Luxton G.W.G., Worman H.J., Gundersen G.G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2011. – Vol. 108 – № 1 – P.131–136.
165. Srsen V. Centrosome proteins form an insoluble perinuclear matrix during muscle cell differentiation / Srsen V., Fant X., Heald R., Rabouille C., Merdes A. // *BMC Cell Biology* – 2009. – Vol. 10 – № 1 – P.1–9.
166. Gimpel P. Nesprin-1 α -Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells / Gimpel P., Lee Y.L., Sobota R.M., Calvi A., Koullourou V., Patel R., Mamchaoui K., Nédélec F., Shackleton S., Schmoranzler J., Burke B., Cadot B., Gomes E.R. // *Current Biology* – 2017. – Vol. 27 – № 19 –

- P.2999.
167. Bakay M. Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb–MyoD pathways in muscle regeneration / Bakay M., Wang Z., Melcon G., Schiltz L., Xuan J., Zhao P., Sartorelli V., Seo J., Pegoraro E., Angelini C., Shneiderman B., Escolar D., Chen Y.W., Winokur S.T., Pachman L.M., Fan C., Mandler R., Nevo Y., Gordon E., Zhu Y., Dong Y., Wang Y., Hoffman E.P. // *Brain* – 2006. – Vol. 129 – № 4 – P.996–1013.
 168. Sylvius N. MicroRNA expression profiling in patients with lamin A/C-associated muscular dystrophy / Sylvius N., Bonne G., Straatman K., Reddy T., Gant T.W., Shackleton S. // *The FASEB Journal* – 2011. – Vol. 25 – № 11 – P.3966–3978.
 169. Machiels B.M. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10 / Machiels B.M., Zorenc A.H.G., Endert J.M., Kuijpers H.J.H., Eys G.J.J.M. Van, Ramaekers F.C.S., Broers J.L.V. // *The Journal of biological chemistry* – 1996. – Vol. 271 – № 16 – P.9249–9253.
 170. Sehgal P. Lamin A/C Haploinsufficiency Modulates the Differentiation Potential of Mouse Embryonic Stem Cells / Sehgal P., Chaturvedi P., Kumaran R.I., Kumar S., Parnaik V.K. // *PLOS ONE* – 2013. – Vol. 8 – № 2 – e57891.
 171. Ahmed K. Global Chromatin Architecture Reflects Pluripotency and Lineage Commitment in the Early Mouse Embryo / Ahmed K., Dehghani H., Rugg-Gunn P., Fussner E., Rossant J., Bazett-Jones D.P. // *PLoS ONE* – 2010. – Vol. 5 – № 5 – e10531.
 172. Peric-Hupkes D. Molecular maps of the reorganization of genome – nuclear lamina interactions during differentiation / Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S.W.M., Solovei I., Brugman W., Gräf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., Lohuizen M. van, Reinders M., Wessels L., Steensel B. van // *Molecular cell* – 2010. – Vol. 38 – № 4 – P.603.
 173. Hindi S.M. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion / Hindi S.M., Tajrish M.M., Kumar A. // *Science signaling* – 2013. – Vol. 6 – № 272 – Pre2.
 174. Leikina E. Myomaker and Myomerger work independently to control distinct steps of membrane remodeling during myoblast fusion / Leikina E., Gamage D.G., Prasad V., Goykhberg J., Crowe M., Diao J., Kozlov M.M., Chernomordik L. V., Millay D.P. // *Developmental cell* – 2018. – Vol. 46 – № 6 – P.767.
 175. Bentzinger C.F. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis / Bentzinger C.F., Wang Y.X., Rudnicki M.A. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* – 2012. – Vol. 4 – № 2 – P.a008342–a008342.
 176. Chal J. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro / Chal J., Pourquié O. // *Development* – 2017. – Vol. 144 – № 12 – P.2104–2122.
 177. Buckingham M. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis / Buckingham M., Rigby P.W.J. // *Developmental cell* – 2014. – Vol. 28 – № 3 –

- P.225–238.
178. Hernández-Hernández J.M. The Myogenic Regulatory Factors, Determinants of Muscle Development, Cell Identity and Regeneration / Hernández-Hernández J.M., García-González E.G., Brun C.E., Rudnicki M.A. // *Seminars in cell & developmental biology* – 2017. – Vol. 72 – P.10.
 179. Massari M.E. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms / Massari M.E., Murre C. // *Molecular and Cellular Biology* – 2000. – Vol. 20 – № 2 – P.429.
 180. Weintraub H. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage / Weintraub H., Davis R., Tapscott S., Thayer M., Krause M., Benezra R., Blackwell T.K., Turner D., Rupp R., Hollenberg S., Zhuang Y., Lassar A. // *Science (New York, N.Y.)* – 1991. – Vol. 251 – № 4995 – P.761–766.
 181. Moncaut N. Dial M(RF) for myogenesis / Moncaut N., Rigby P.W.J., Carvajal J.J. // *The FEBS journal* – 2013. – Vol. 280 – № 17 – P.3980–3990.
 182. Cenciarelli C. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation / Cenciarelli C., Santa F. De, Puri P.L., Mattei E., Ricci L., Bucci F., Felsani A., Caruso M. // *Molecular and cellular biology* – 1999. – Vol. 19 – № 7 – P.5203–5217.
 183. Novitch B.G. pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation / Novitch B.G., Spicer D.B., Kim P.S., Cheung W.L., Lassar A.B. // *Current biology* – 1999. – Vol. 9 – № 9 – P.449–459.
 184. Huh M.S. Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation / Huh M.S., Parker M.H., Scimè A., Parks R., Rudnicki M.A. // *The Journal of Cell Biology* – 2004. – Vol. 166 – № 6 – P.865.
 185. Guo C.S. Regulation of MyoD activity and muscle cell differentiation by MDM2, pRb, and Sp1 / Guo C.S., Degnin C., Fiddler T.A., Stauffer D., Thayer M.J. // *The Journal of biological chemistry* – 2003. – Vol. 278 – № 25 – P.22615–22622.
 186. Puri P.L. Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis / Puri P.L., Iezzi S., Stiegler P., Chen T.T., Schiltz R.L., Muscat G.E.O., Giordano A., Kedes L., Wang J.Y.J., Sartorelli V. // *Molecular cell* – 2001. – Vol. 8 – № 4 – P.885–897.
 187. Mancini M.A. The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein / Mancini M.A., Shan B., Nickerson J.A., Penman S., Lee W.H. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1994. – Vol. 91 – № 1 – P.418–422.
 188. Ozaki T. Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. / Ozaki T., Saijo M.,

- Murakami K., Enomoto H., Taya Y., Sakiyama S. // *Oncogene* – 1994. – Vol. 9 – № 9 – P.2649–2653.
189. Johnson B.R. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation / Johnson B.R., Nitta R.T., Frock R.L., Mounkes L., Barbie D.A., Stewart C.L., Harlow E., Kennedy B.K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2004. – Vol. 101 – № 26 – P.9677–9682.
190. Gesson K. Lamina-associated polypeptide (LAP)2 α and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease / Gesson K., Vidak S., Foisner R. // *Seminars in Cell & Developmental Biology* – 2014. – Vol. 29 – № 100 – P.116.
191. Kollias H.D. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle / Kollias H.D., McDermott J.C. // *Journal of applied physiology* – 2008. – Vol. 104 – № 3 – P.579–587.
192. Athar F. Association of lamin A/C with muscle gene-specific promoters in myoblasts / Athar F., Parnaik V.K. // *Biochemistry and Biophysics Reports* – 2015. – Vol. 4 – P.76–82.
193. Gallagher D. Organ-tissue mass measurement allows modeling of REE and metabolically active tissue mass / Gallagher D., Belmonte D., Deurenberg P., Wang Z., Krasnow N., Pi-Sunyer F.X., Heymsfield S.B. // *The American journal of physiology* – 1998. – Vol. 275 – № 2 – P.249-258.
194. Blei M.L. Separate measures of ATP utilization and recovery in human skeletal muscle. / Blei M.L., Conley K.E., Kushmerick M.J. // *The Journal of Physiology* – 1993. – Vol. 465 – № 1 – P.203–222.
195. Gaitanos G.C. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise / Gaitanos G.C., Williams C., Boobis L.H., Brooks S. // *Journal of Applied Physiology* – 1993. – Vol. 75 – № 2 – P.712–719.
196. Herst P.M. Functional mitochondria in health and disease // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2017. – Vol. 8. – P.296.
197. Cogliati S. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency / Cogliati S., Frezza C., Soriano M.E., Varanita T., Quintana-Cabrera R., Corrado M., Cipolat S., Costa V., Casarin A., Gomes L.C., Perales-Clemente E., Salviati L., Fernandez-Silva P., Enriquez J.A., Scorrano L. // *Cell* – 2013. – Vol. 155 – № 1 – P.160–171.
198. Bulthuis E.P. Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells // *Antioxidants Redox Signal.* – 2019. – Vol. 30. – № 18. – P.2066–2109.
199. Leduc-Gaudet J.P. Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging / Leduc-Gaudet J.P., Hussain S.N.A., Barreiro E., Gousspillou G. // *International Journal*

- of Molecular Sciences – 2021. – Vol. 22 – № 15 – P.8179.
200. Hamai N. Inhibition of Mitochondria! Protein Synthesis Impaired C2C12 Myoblast Differentiation / Hamai N., Nakamura M., Asano A. // Cell Structure and Function – 1997. – Vol. 22 – № 4 – P.421–431.
 201. Rochard P. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors / Rochard P., Rodier A., Casas F., Cassar-Malek I., Marchal-Victorion S., Daury L., Wrutniak C., Cabello G. // The Journal of biological chemistry – 2000. – Vol. 275 – № 4 – P.2733–2744.
 202. Seyer P. Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression / Seyer P., Grandemange S., Busson M., Carazo A., Gamaléri F., Pessemesse L., Casas F., Cabello G., Wrutniak-Cabello C. // Journal of cellular physiology – 2006. – Vol. 207 – № 1 – P.75–86.
 203. Eshima H. Mitochondrial calcium regulation during and following contractions in skeletal muscle / Eshima H., Poole D.C., Kano Y. // The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine – 2018. – Vol.7 – №4 – P.205-211.
 204. Remels A.H.V. Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis / Remels A.H.V., Langen R.C.J., Schrauwen P., Schaart G., Schols A.M.W.J., Gosker H.R. // Molecular and Cellular Endocrinology – 2010. – Vol. 315 – № 1–2 – P.113–120.
 205. Wagatsuma A. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis / Wagatsuma A., Sakuma K. // The Scientific World Journal – 2013. – Vol. 2013 – P.593267.
 206. Shao Z. RNA Sequence Analyses throughout the Course of Mouse Cardiac Laminopathy Identify Differentially Expressed Genes for Cell Cycle Control and Mitochondrial Function / Shao Z., Koh W., Ni Y., Li W., Agatista-Boyle B., Merkurjev D., Tang W.H.W. // Scientific Reports – 2020. – Vol. 10 – № 1 – P.1–14.
 207. Bonne G. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene / Bonne G., Mercuri E., Muchir A., Urtizberea A., Bécane H.M., Recan D., Merlini L., Wehnert M., Boor R., Reuner U., Vorgerd M., Wicklein E.M., Eymard B., Duboc D., Penisson-Besnier I., Cuisset J.M., Ferrer X., Desguerre I., Lacombe D., Bushby K., Pollitt C., Toniolo D., Fardeau M., Schwartz K., Muntoni F. // Annals of Neurology – 2000. – Vol. 48 – № 2 – P.170–180.
 208. Fan Y. Clinical spectrum and genetic variations of LMNA-related muscular dystrophies in a large cohort of Chinese patients Genotype-phenotype correlations / Fan Y., Tan D., song D., Zhang X., chang X., Wang Z., Zhang cheng, hoi-shan chan sophelia, Wu Q., Wu liwen, Wang shuang, Yan hui, ge lin, Yang haipo, Mao B., Bönnemann carsten, liu J., Wang suxia, Yuan Y., Wu X., Zhang hong, Xiong hui // J Med Genet – 2020. – Vol. 58 – №5 – P.326–333.

209. Bidault G. Lipodystrophy-linked LMNA p.R482W mutation induces clinical early atherosclerosis and in vitro endothelial dysfunction / Bidault G., Garcia M., Vantyghem M.C., Ducluzeau P.H., Morichon R., Thiagarajah K., Moritz S., Capeau J., Vigouroux C., Béréziat V. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* – 2013. – Vol. 33 – № 9 – P.2162–2171.
210. Guénantin A.C. Nuclear envelope-related lipodystrophies / Guénantin A.C., Briand N., Bidault G., Afonso P., Béréziat V., Vatier C., Lascols O., Caron-Debarle M., Capeau J., Vigouroux C. // *Seminars in cell & developmental biology* – 2014. – Vol. 29 – P.148–157.
211. Van der Kooi A.J. Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities, and muscular dystrophy / Kooi A.J. Van der, Bonne G., Eymard B., Duboc D., Talim B., Valk M. Van der, Reiss P., Richard P., Demay L., Merlini L., Schwartz K., Busch H.F.M., Visser M. De // *Neurology* – 2002. – Vol. 59 – № 4 – P.620–623.
212. Vantyghem M.C. Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. / 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., Vigouroux C. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* – 2004. – Vol. 89 – № 11 – P.5337–46.
213. Ji H. Increased Skeletal Muscle Volume in Women With Familial Partial Lipodystrophy, Dunnigan Variety / Ji H., Weatherall P., Adams-Huet B., Garg A. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* – 2013. – Vol. 98 – № 8 – P.E1410–E1413.
214. Khromova N. V. R482L Mutation of the LMNA Gene Affects Dynamics of C2C12 Myogenic Differentiation and Stimulates Formation of Intramuscular Lipid Droplets / Khromova N. V., Perepelina K.I., Ivanova O.A., Malashicheva A.B., Kostareva A.A., Dmitrieva R.I. // *Biochemistry (Moscow)* – 2019. – Vol. 84 – № 3 – P.241–249.
215. Bogdanova M.A. Nuclear lamins regulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / Bogdanova M.A., Gudkova A.Y., Zabirnik A.S., Ignatieva E. V., Dmitrieva R.I., Smolina N.A., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. // *Cell and Tissue Biology* – 2014. – Vol. 8 – № 4 – P.292–298.
216. Malashicheva A. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner / Malashicheva A., Bogdanova M., Zabirnyk 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.
217. Malashicheva A. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations / Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. // *Genesis* – 2007. – Vol. 45 – № 7 – P.456–459.
218. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

- T4 / Laemmli U.K. // *Nature* – 1970. – Vol. 227 – № 5259 – P.680–685.
219. Winter L. Mutant desmin substantially perturbs mitochondrial morphology, function and maintenance in skeletal muscle tissue / Winter L., Wittig I., Peeva V., Eggers B., Heidler J., Chevessier F., Kley R.A., Barkovits K., Strecker V., Berwanger C., Herrmann H., Marcus K., Kornblum C., Kunz W.S., Schröder R., Clemen C.S. // *Acta Neuropathologica* – 2016. – Vol. 132 – № 3 – P.453.
220. Chen S. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor / Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. // *Bioinformatics (Oxford, England)* – 2018. – Vol. 34 – № 17 – P.i884–i890.
221. Dobin A. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner / Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // *Bioinformatics* – 2013. – Vol. 29 – № 1 – P.15–21.
222. Liao Y. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features / Liao Y., Smyth G.K., Shi W. // *Bioinformatics* – 2014. – Vol. 30 – № 7 – P.923–930.
223. Love M.I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / Love M.I., Huber W., Anders S. // *Genome Biology* – 2014. – Vol. 15 – № 12 – P.1–21.
224. Korotkevich G. An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation / Korotkevich G., Sukhov V., Budin N., Shpak B., Artyomov M., Sergushichev A. // *bioRxiv* – 2016. – P.060012.
225. Liberzon A. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection / Liberzon A., Birger C., Thorvaldsdóttir H., Ghandi M., Mesirov J.P., Tamayo P. // *Cell systems* – 2015. – Vol. 1 – № 6 – P.417.
226. 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.
227. Kubben N. Identification of differential protein interactors of lamin a and progerin / Kubben N., Voncken J.W., Demmers J., Calis C., Almen G. van, Pinto Y., Misteli T. // *Nucleus* – 2010. – Vol. 1 – № 6 – P.513–525.
228. Kubben N. Mapping of lamin A- and progerin-interacting genome regions / Kubben N., Adriaens M., Meuleman W., Voncken J.W., Steensel B. Van, Misteli T. // *Chromosoma* – 2012. – Vol. 121 – № 5 – P.447–464.
229. Bechert K. Effects of expressing lamin A mutant protein causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy and familial partial lipodystrophy in HeLa cells / Bechert K., Lagos-Quintana M., Harborth J., Weber K., Osborn M. // *Experimental Cell Research* – 2003. – Vol. 286 – № 1 –

- P.75–86.
230. 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.
 231. Perepelina K. Tissue-Specific Influence of Lamin A Mutations on Notch Signaling and Osteogenic Phenotype of Primary Human Mesenchymal Cells / Perepelina K., Klauzen P., Kostareva A., Malashicheva A. // *Cells* – 2019. – Vol. 8 – № 3 – P.266.
 232. Constantinescu D. Lamin A/C Expression Is a Marker of Mouse and Human Embryonic Stem Cell Differentiation / Constantinescu D., Gray H.L., Sammak P.J., Schatten G.P., Csoka A.B. // *STEM CELLS* – 2006. – Vol. 24 – № 1 – P.177–185.
 233. Millay D.P. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation / Millay D.P., O'Rourke J.R., Sutherland L.B., Bezprozvannaya S., Shelton J.M., Bassel-Duby R., Olson E.N. // *Nature* – 2013. – Vol. 499 – № 7458 – P.301–305.
 234. Zhang Q. The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation / Zhang Q., Vashisht A.A., O'Rourke J., Corbel S.Y., Moran R., Romero A., Miraglia L., Zhang J., Durrant E., Schmedt C., Sampath S.C., Sampath S.C. // *Nature communications* – 2017. – Vol. 8 – P.15664.
 235. Ganassi M. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size / Ganassi M., Badodi S., Ortuste Quiroga H.P., Zammit P.S., Hinitis Y., Hughes S.M. // *Nature Communications* – 2018. – Vol. 9 – № 1 – P.1–17.
 236. Pownall M.E. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos / Pownall M.E., Gustafsson M.K., Emerson C.P. // *Annual review of cell and developmental biology* – 2002. – Vol. 18 – P.747–783.
 237. Mookerjee S.A. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements / Mookerjee S.A., Gerencser A.A., Nicholls D.G., Brand M.D. // *The Journal of biological chemistry* – 2017. – Vol. 292 – № 17 – P.7189–7207.
 238. Park Y.E. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B / Park Y.E., Hayashi Y.K., Goto K., Komaki H., Hayashi Y., Inuzuka T., Noguchi S., Nonaka I., Nishino I. // *Neuromuscular Disorders* – 2009. – Vol. 19 – № 1 – P.29–36.
 239. Novelli G. Mandibuloacral Dysplasia Is Caused by a Mutation in LMNA-Encoding Lamin A/C / Novelli G., Muchir A., Sangiulio F., Helbling-Leclerc A., D'apice M.R., Massart C., Capon F., Sbraccia P., Federici M., Lauro R., Tudisco C., Pallotta R., Scarano G., Dallapiccola B.,

- Merlini L., Bonne G. // *The American Journal of Human Genetics* – 2002. – Vol. 71 – № 2 – P.426–431.
240. Muchir A. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations / Muchir A., Medioni J., Laluc M., Massart C., Arimura T., Kooi A.J. Van Der, Desguerre I., Mayer M., Ferrer X., Briault S., Hirano M., Worman J., Mallet A., Wehnert M., Schwartz K., Bonne G. // *Muscle & Nerve* – 2004. – Vol. 30 – № 4 – P.444–450.
241. Verstraeten V.L.R.M. The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress / Verstraeten V.L.R.M., Caputo S., Steensel M.A.M. van, Duband-Goulet I., Zinn-Justin S., Kamps M., Kuijpers H.J.H., Östlund C., Worman H.J., Briedé J.J., Dour C. Le, Marcelis C.L.M., Geel M. van, Steijlen P.M., Wijngaard A. van den, Ramaekers F.C.S., Broers J.L.V. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2009. – Vol. 13 – № 5 – P.959–971.
242. Steele-Stallard H.B. Modeling skeletal muscle laminopathies using human induced pluripotent stem cells carrying pathogenic LMNA mutations / Steele-Stallard H.B., Pinton L., Sarcar S., Ozdemir T., Maffioletti S.M., Zammit P.S., Tedesco F.S. // *Frontiers in Physiology* – 2018. – Vol. 9 – № OCT – P.1–19.
243. Favreau C. Expression of lamin a mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy / Favreau C., Dubosclard E., Östlund C., Vigouroux C., Capeau J., Wehnert M., Higuët D., Worman H.J., Courvalin J.C., Buendia B. // *Experimental Cell Research* – 2003. – Vol. 282 – № 1 – P.14–23.
244. Scharner J. Novel LMNA mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and functional characterization of four LMNA mutations / Scharner J., Brown C.A., Bower M., Iannaccone S.T., Khatri I.A., Escolar D., Gordon E., Felice K., Crowe C.A., Grosman C., Meriggioli M.N., Asamoah A., Gordon O., Gnocchi V.F., Ellis J.A., Mendell J.R., Zammit P.S. // *Human Mutation* – 2011. – Vol. 32 – № 2 – P.152–167.
245. Barateau A. Distinct Fiber Type Signature in Mouse Muscles Expressing a Mutant Lamin A Responsible for Congenital Muscular Dystrophy in a Patient / Barateau A., Vadrot N., Agbulut O., Vicart P., Batonnet-Pichon S., Buendia B. // *Cells* – 2017. – Vol. 6 – № 2 – P.10.
246. Capanni C. Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription / Capanni C., Cenni V., Mattioli E., Sabatelli P., Ognibene A., Columbaro M., Parnaik V.K., Wehnert M., Maraldi N.M., Squarzoni S., Lattanzi G. // *Experimental Cell Research* – 2003. – Vol. 291 – № 1 – P.122–134.

247. Gnocchi V.F. Does satellite cell dysfunction contribute to disease progression in Emery-Dreifuss muscular dystrophy? / Gnocchi V.F., Ellis J.A., Zammit P.S. // *Biochemical Society transactions* – 2008. – Vol. 36 – № Pt 6 – P.1344–1349.
248. Bianchi A. Dysfunctional polycomb transcriptional repression contributes to lamin A/C-dependent muscular dystrophy / Bianchi A., Mozzetta C., Pegoli G., Lucini F., Valsoni S., Rosti V., Petrini C., Cortesi A., Gregoret F., Antonelli L., Oliva G., Bardi M. de, Rizzi R., Bodega B., Pasini D., Ferrari F., Bearzi C., Lanzuolo C. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2020. – Vol. 130 – № 5 – P.2408–2421.
249. Spuler S. Muscle and nerve pathology in Dunnigan familial partial lipodystrophy / Spuler S., Kalbhenn T., Zabojszcza J., Landeghem F.K.H. Van, Ludtke A., Wenzel K., Koehnlein M., Schuelke M., Lüdemann L., Schmidt H.H. // *Neurology* – 2007. – Vol. 68 – № 9 – P.677–683.
250. Timpani C.A. Revisiting the dystrophin-ATP connection: How half a century of research still implicates mitochondrial dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy aetiology / Timpani C.A., Hayes A., Rybalka E. // *Medical hypotheses* – 2015. – Vol. 85 – № 6 – P.1021–1033.
251. Rosca M.G. Mitochondrial dysfunction in heart failure / Rosca M.G., Hoppel C.L. // *Heart failure reviews* – 2013. – Vol. 18 – № 5 – P.607–622.
252. Ferri E. Role of Age-Related Mitochondrial Dysfunction in Sarcopenia / Ferri E., Marzetti E., Calvani R., Picca A., Cesari M., Arosio B. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2020. – Vol. 21 – Vol. 21 – № 15 – P.5236.
253. Leary S.C. Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis / Leary S.C., Battersby B.J., Hansford R.G., Moyes C.D. // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* – 1998. – Vol. 1365 – № 3 – P.522–530.
254. Shintaku J. MyoD Regulates Skeletal Muscle Oxidative Metabolism Cooperatively with Alternative NF- κ B / Shintaku J., Peterson J.M., Talbert E.E., Gu J.M., Ladner K.J., Williams D.R., Mousavi K., Wang R., Sartorelli V., Guttridge D.C. // *Cell Reports* – 2016. – Vol. 17 – № 2 – P.514–526.
255. Pala F. Distinct metabolic states govern skeletal muscle stem cell fates during prenatal and postnatal myogenesis / Pala F., Girolamo D. Di, Mella S., Yennek S., Chatre L., Ricchetti M., Tajbakhsh S. // *Journal of Cell Science* – 2018. – Vol. 131 – № 14 – P.jsc212977.
256. Reggio A. Metabolic reprogramming of fibro/adipogenic progenitors facilitates muscle regeneration / Reggio A., Rosina M., Krahmer N., Palma A., Petrilli L.L., Maiolatesi G., Massacci G., Salvatori I., Valle C., Testa S., Gargioli C., Fuoco C., Castagnoli L., Cesareni G., Sacco F. // *Life Science Alliance* – 2020. – Vol. 3 – № 3 – e202000646.
257. Cerletti M. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function / Cerletti M., Jang Y.C., Finley L.W.S., Haigis M.C., Wagers A.J. // *Cell Stem Cell* – 2012. – Vol. 10 – №

- 5 – P.515–519.
258. Desler C. Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? / Desler C., Hansen T.L., Frederiksen J.B., Marcker M.L., Singh K.K., Juel Rasmussen L. // *Journal of aging research* – 2012. – Vol. 2012 – P.192503.
259. Ryu D. NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global parylation / Ryu D., Zhang H., Ropelle E.R., Sorrentino V., Mázala D.A.G., Mouchiroud L., Marshall P.L., Campbell M.D., Ali A.S., Knowels G.M., Bellemin S., Iyer S.R., Wang X., Gariani K., Sauve A.A., Cantó C., Conley K.E., Walter L., Lovering R.M., Chin E.R., Jasmin B.J., Marcinek D.J., Menzies K.J., Auwerx J. // *Science Translational Medicine* – 2016. – Vol. 8 – № 361 – P.361ra139.
260. Mohiuddin M. Transplantation of Muscle Stem Cell Mitochondria Rejuvenates the Bioenergetic Function of Dystrophic Muscle / Mohiuddin M., Choi J.J., Lee N.H., Jeong H., Anderson S.E., Han W.M., Aliya B., Peykova T.Z., Verma S., García A.J., Aguilar C.A., Jang Y.C. // *bioRxiv* – 2020. – P.2020.04.17.017822.
261. Belli R. Metabolic reprogramming promotes myogenesis during aging / Belli R., Bonato A., Angelis L. De, Mirabilii S., Ricciardi M.R., Tafuri A., Molfino A., Leigheb M., Costelli P., Caruso M., Muscaritoli M., Ferraro E. // *Frontiers in Physiology* – 2019. – Vol. 10 – № JUL – P.897.

ПРИЛОЖЕНИЕ

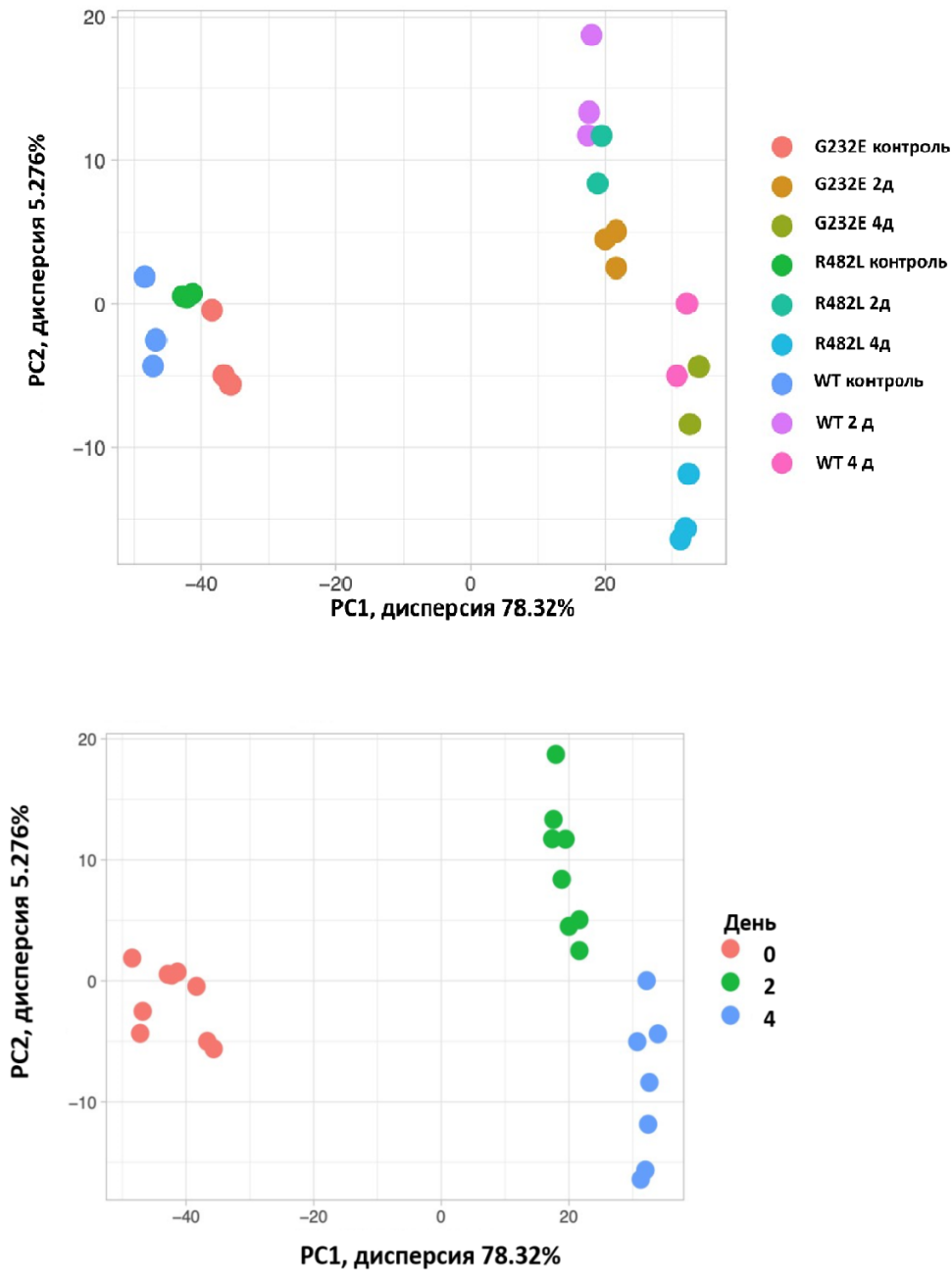


Рисунок 1. Графики PCA (Principal Component Analysis, анализ главных компонент) для всех образцов. Контроль – недифференцированные миобласты, «2д» – день 2 дифференцировки, «4д» – день 4 дифференцировки (терминальная стадия). Для каждого биологического условия проанализированы 3 повтора. Анализ сделан на основе регуляризованных логарифмических преобразований. На графике сверху образцы окрашены в соответствии с биологическими условиями, тогда как на графике внизу – применительно ко дню дифференцировки. Оба графика PCA показали в основном кластеризацию образцов на 3 большие группы в зависимости от дня миогенной дифференцировки.

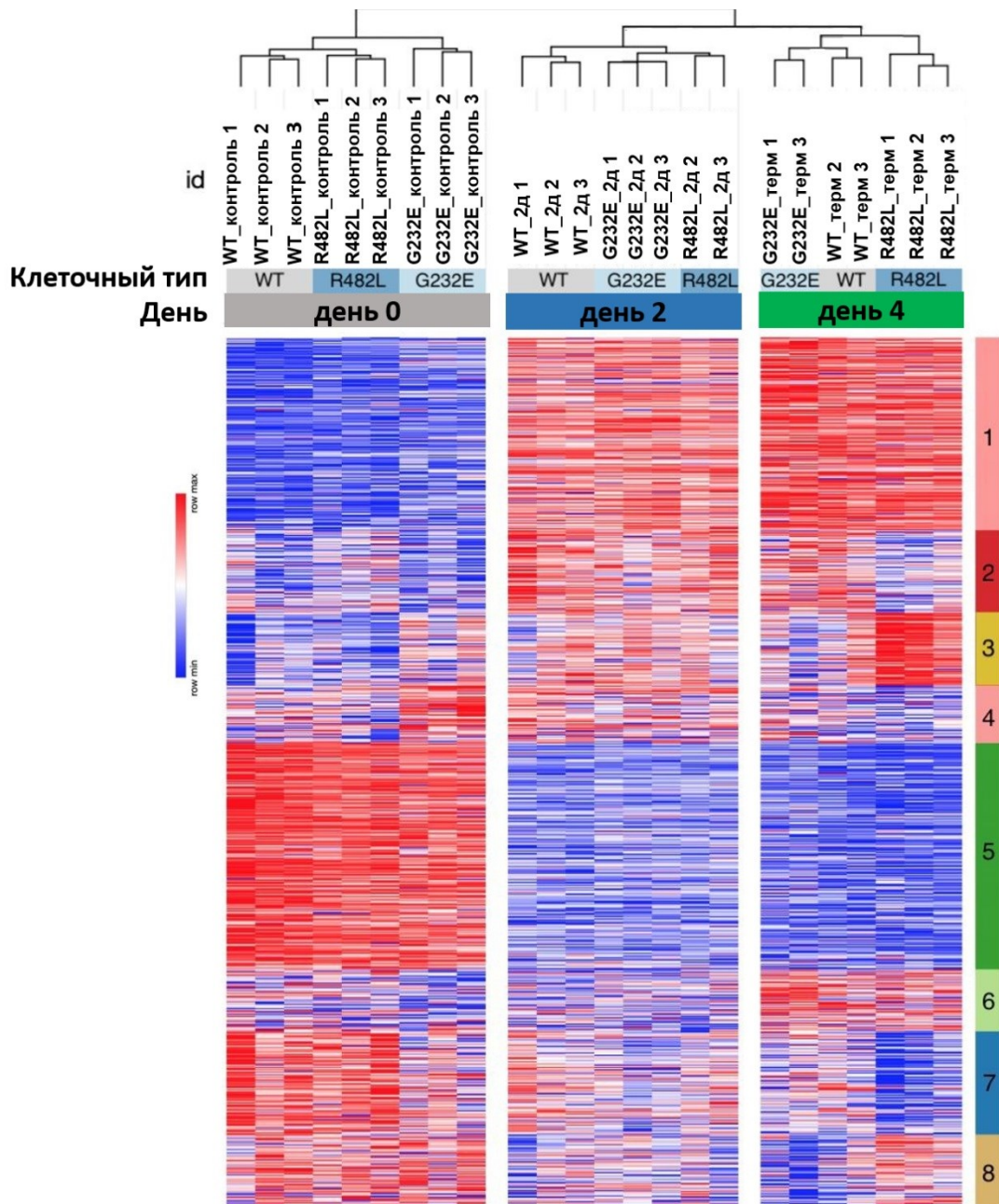


Рисунок 2. Тепловая карта нормализованных прочтений для 24 образцов и 14,321 генов. После квантильной и логарифмической нормализации данные были отфильтрованы от низких значений. Каждое биологическое состояние (9 состояний) представлено 2 или 3 биологическими повторами после исключения выбросов. Иерархическая кластеризация была применена к выборкам (верх рисунка) и показала разделение образцов, объясняемое в основном днями дифференцировки; однако, различия наблюдались и между мутантными трансгенными клеточными линиями. Гены были сгруппированы в 8 групп на основе сходства в их экспрессии с использованием метода k-средних: приблизительно 50% генов находятся в кластерах 1 и 5 и ответственны за процессы дифференцировки миобластов и выход из клеточного цикла, соответственно.

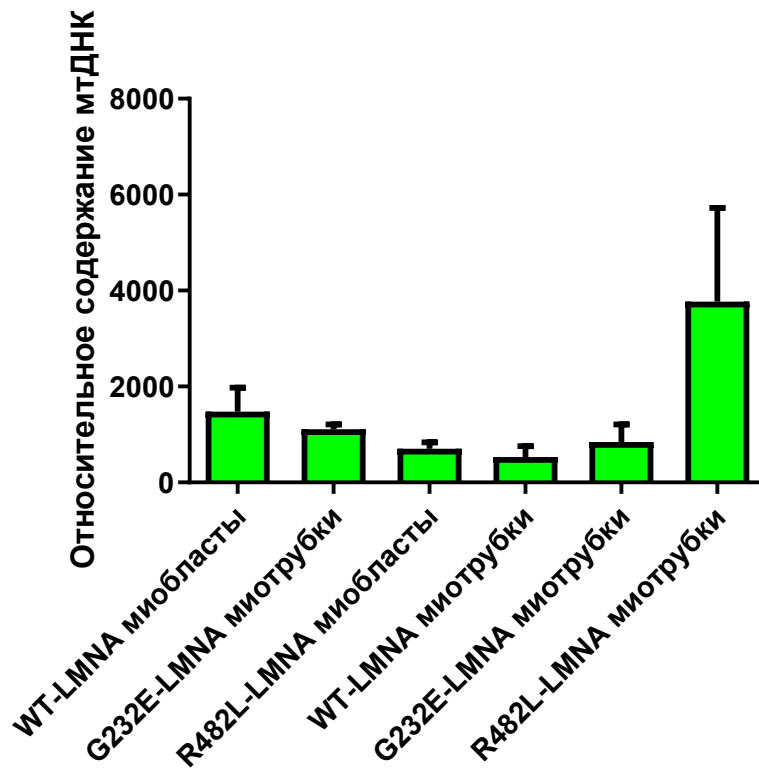


Рисунок 3. Относительное содержание митохондриальной ДНК в клетках трансгенных линий C2C12, проанализированное методом ПЦР в реальном времени. Относительное содержание митохондриальной ДНК (мтДНК) определялось количественно из общей ДНК как число копий мтДНК, нормализованное к числу копий ядерного гена *Kcnj13*, представленного в геноме единственной копией. Данные показаны в виде среднего значения±SEM. n=4. Значимость определялась методом ANOVA (множественных сравнений с применением критерия Тьюки) при использовании GraphPad Prism (версия 8.4.1). Не было обнаружено значимых различий между группами.