

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Перепелина Ксения Игоревна

Влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на процесс дифференцировки
клеток

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Малашичева Анна Борисовна

Санкт-Петербург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Ядерные ламины.....	11
1.2 Структура, созревание и сборка ламина А/С.....	12
1.3 Ламин А/С-ассоциированные белки	14
1.4 Участие ламина А/С в тканеспецифической регуляции дифференцировки клеток	16
1.4.1 Роль ламина А/С в передаче механических сигналов, опосредующих дифференцировку клеток.....	16
1.4.2 Роль ламина А/С в регуляции организации хроматина и экспрессии генов	19
1.4.3 Взаимодействие ламина А/С с сигнальными путями во время дифференцировки клеток.....	22
1.5 Ламинопатии.....	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	29
2.1 Клеточные культуры.....	29
2.1.1 Получение и культивирование сателлитных клеток мыши.....	29
2.1.2 Миобласты линии С2С12	29
2.1.3 Интерстициальные клетки аортального клапана человека (ИК)	30
2.1.4 Гладкомышечные клетки аорты человека (ГМК)	30
2.1.5 Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭК).....	30
2.1.6 Мезенхимные клетки сердца человека (МКС).....	31
2.1.7 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)	32
2.2 Плазмиды.....	35
2.3 Производство лентивирусных частиц	35
2.4 Иммуноцитохимическая окраска клеток.....	35
2.5 Анализ экспрессии генов	36
2.6 Статистическая обработка данных, полученных после реакции ПЦР в режиме реального времени.....	39
2.7 Полуколичественная ПЦР.	39
2.8 Реакция на щелочную фосфатазу	40
2.9 Определение уровня активации репортерной конструкции	40
2.10 Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp).....	41
2.11 Анализ данных	41
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	43
3.1 Исследование влияния тканеспецифичных мутаций в гене <i>LMNA</i> на мышечную дифференцировку.....	43
3.1.1 Влияние G232E и R571S мутаций в гене <i>LMNA</i> на процесс формирования	

миотрубок... ..	43
3.1.2 Влияние G232E и R571L мутаций в гене <i>LMNA</i> на экспрессию основных генов мышечной дифференцировки	46
3.1.3 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния мутаций в гене <i>LMNA</i> (G232E и R571S) на процесс мышечной дифференцировки миобластов мышцы линии C2C12 и первичных сателлитных клеток мыши	47
3.2 Исследование влияние мутаций в гене <i>LMNA</i> на процесс адипогенной дифференцировки.....	49
3.2.1 Оценка морфологии ядер.....	49
3.2.2 Оценка влияния <i>LMNA</i> R482L на активность сигнального пути Notch в недифференцированных клетках	50
3.2.3 Оценка влияния <i>LMNA</i> R482L на адипогенную дифференцировку в условиях активации Notch	51
3.2.4 Оценка влияния <i>LMNA</i> R482L на активность сигнального пути Notch в дифференцированных МКС.....	53
3.2.5 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния мутации в гене <i>LMNA</i> (R482L) на адипогенную дифференцировку и функционирование сигнального пути Notch.....	54
3.3 Исследование влияния тканеспецифичных мутаций в гене <i>LMNA</i> на процесс остеогенной дифференцировки мезенхимных клеток человека.....	55
3.3.1 Оценка морфологии ядер МКС крысы, экспрессирующих трансгенные формы ламина А/С	56
3.3.2 Оценка влияния <i>LMNA</i> R527C и <i>LMNA</i> R471C на экспрессию остеогенных маркеров в мезенхимных клетках человека (ЭК, МКС, ГМК и ИК).....	56
3.3.3 Оценка влияния мутаций <i>LMNA</i> R527C/R471C на экспрессию генов-мишеней Notch в мезенхимных клетках человека	59
3.3.4 Оценка влияния мутации <i>LMNA</i> R527C на остеогенную дифференцировку МКС и ИК в условиях активации Notch.....	62
3.3.5 Анализ экспрессии остеогенных маркеров и генов-мишеней сигнального пути Notch в разных линиях недифференцированных мезенхимных клеток.....	64
3.3.6 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния мутаций в гене <i>LMNA</i> (R527C и R471C) на процесс остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения	65
3.4 Исследование эффекта пациент-специфической мутации в гене <i>LMNA</i> на процесс кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.....	67
3.4.1 Получение и характеристика линии ИПСК, несущей <i>LMNA</i> R249Q мутацию	67
3.4.2 Создание модели кардиомиоцитов на основе ИПСК (ИПСК-КМЦ)	70
3.4.3 Оценка влияния <i>LMNA</i> R2249Q мутации на экспрессионный профиль КМЦ на поздней стадии дифференцировки	72
3.4.4 Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов, полученных из ИПСК пациента с мутацией <i>LMNA</i> R249Q.....	73
3.4.5 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния <i>LMNA</i> R249Q мутации на процесс кардиогенной дифференцировки ИПСК.....	76

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
Список сокращений	83
Список литературы	84

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ламины А типа являются основными структурными белками ядерной оболочки клетки и относятся к классу промежуточных филаментов V типа. Ламиновые филаменты представляют собой упорядоченную структуру, ядерную ламину, которая обеспечивает прочность ядерной мембраны клетки (Naetar et al., 2017). Первоначально считалось, что ядерные ламины А-типа выполняют исключительно структурную роль, обеспечивая сохранение формы и жесткости ядра. Однако, в настоящее время ламины А-типа известны как важные регуляторы экспрессии генов и ключевые медиаторы детерминации судьбы клеток. Доказано участие ламина А/С в организации хроматина, репликации ДНК, регуляции транскрипции генов, дифференцировке клеток и д.р. Ламины А-типа выполняют большинство этих функций благодаря взаимодействию с белками внутренней ядерной мембраны, факторами транскрипции и ДНК. Считается, что ламины А-типа регулируют активность важных сигнальных путей в клетках (таких как Rb / E2F, Wnt / β -катенин, TGF β , Notch) посредством их прямого или косвенного взаимодействия с другими белками.

Ламинопатии представляют собой широкую группу заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене ламина А/С (*LMNA*). Клинические фенотипы ламинопатий крайне разнообразны и включают кардиомиопатии, миопатии и миодистрофии, нарушения ритма, поражение центральной и периферической нервной системы, а также прогерия. Несмотря на большую актуальность данных исследований в связи с тяжестью течения и неблагоприятным прогнозом большинства ламинопатий, механизмы, посредством которых ядерные ламины вызывают развитие столь различных, на первый взгляд, заболеваний с поражением разных систем и органов, остаются нераскрытыми. Понимание механизмов функционирования ламинов, а также их роли при развитии патологий при мутации в гене *LMNA* представляется крайне актуальным в связи со стремительным ростом описаний новых форм ламино-ассоциированных заболеваний (Burke and Stewart 2013; Dubinska-Magiera et al. 2013; de Las Heras et al. 2014).

С учетом экспрессии ламинов А-типа во всех типах дифференцированных клеток представляется неясным избирательное поражение тканей. Наиболее известной модификацией ламина А/С является прогерин, вызывающий серьезное нарушение развития – синдром преждевременного старения или прогерия. Это известное заболевание встречается крайне редко. В то же время точечные мутации *LMNA*, приводящие к повреждению тканей, встречаются чаще. Молекулярные механизмы, посредством которых мутации *LMNA* нарушают процессы дифференцировки стволовых клеток, к настоящему моменту подробно не описаны. Известно, что ламины могут взаимодействовать с компонентами различных сигнальных путей в клетке. Одним из основных сигнальных путей, отвечающих за межклеточную сигнализацию и дифференцировку

клеток, является сигнальный путь Notch (Andersson et al., 2011). Роль самого сигнального пути Notch в процессе дифференцировки разных типов клеток остаётся недостаточно изученной, что является отдельной, также актуальной темой для исследований. На модели прогерии, было показано, что мутантная форма *LMNA*, кодирующая укороченную форму ламина А, прогерин, оказывает влияние на функционирование сигнального пути Notch (Meshorer and Gruenbaum, 2008; Scaffidi and Misteli, 2008).

В последнее время исследования в основном сосредоточены на изучении молекулярных механизмов развития ламинопатий. Предлагаемые механизмы развития патологии включают нарушение организации хроматина, внутриклеточной передачи сигнала, а также эпигенетические изменения. Вероятно, все эти изменения приводят к нарушению регуляции генов, ответственных за дифференцировку клеток. Участки взаимодействия ламин-хроматин (ламин-ассоциированные домены - LADs), как известно, участвуют в регуляции экспрессии генов. LADs содержат множество генов, связанных с дифференцировкой, которые находятся в активном или неактивном состоянии в зависимости от их ассоциации с хроматином. Активная экспрессия генов связана с высвобождением LAD от ядерной ламина. Напротив, инактивация экспрессии является результатом прикрепления LAD к ламине.

Трудности в изучении роли ламина А/С в дифференцировке клеток связаны, в частности, с отсутствием единой экспериментальной модели. На сегодняшний момент актуальным является использование прогениторных клеток различного происхождения для воссоздания модели ламинопатий. Так, в нашем исследовании мы используем спектр различных клеток, способных дифференцироваться в миогенном, адипогенном, остеогенном направлениях. Для изучения эффекта мутаций *LMNA* на дифференцировку клеток мы применяем методику введения мутантного гена *LMNA* на лентивирусном носителе. Модификация генома клеток с помощью введения экзогенных форм ламина А/С с мутацией, позволяет изучать те изменения в клетках, которые возникают вследствие мутаций, что в конечном счете приводит к развитию ламинопатий. В настоящее время особенно актуальным является изучение механизмов развития ламинопатий с использованием модели индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов, несущих мутации в гене *LMNA*. Дифференцировка ИПСК, в частности в кардиомиоцитарном направлении, позволяет воссоздать картину заболевания на клетках, которые несут генотип пациента.

Таким образом раскрытие механизмов влияния ядерных ламинов А-типа на дифференцировку клеток является актуальным направлением как с точки зрения фундаментальной биологии, так и с точки зрения практического применения. Применение нескольких клеточных моделей, используемых для воссоздания картины заболеваний, вызванных мутациями в гене *LMNA*, позволит ближе приблизиться механизму развития тканеспецифичных нарушений.

Также актуальность исследований в данной области продиктована потенциальной возможностью разработки терапевтических подходов на основе выяснения основных механизмов патогенеза ламинопатий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные вносят существенный вклад в фундаментальные представления о роли белков ламинов А-типа в процесс дифференцировки клеток, а также о молекулярных механизмах, лежащих в основе развития ламинопатий. Результаты исследования демонстрируют индивидуальный клеточный ответ при действии разных мутаций в гене *LMNA* на дифференцировку различных клеток мезенхимного происхождения, тем самым подтверждая тканеспецифичный характер развития ламинопатий. Предлагаемое исследование представляет несомненный интерес и важность для Российской науки и медицины. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования для более глубокого понимания тонкой молекулярной основы развития заболеваний. Мы предполагаем, что наша работа может быть толчком для будущих стратегий в клеточной терапии в отношении генетически обусловленных заболеваний – ламинопатий.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы: изучить влияние мутаций в гене *LMNA* на процессы дифференцировки клеток.

Задачи:

1. Изучить влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на миогенную дифференцировку мышечных миобластов линии C2C12 и первичных сателлитных клеток мышцы.
2. Изучить влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на адипогенную дифференцировку мезенхимных клеток сердца человека.
3. Изучить влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на остеогенную дифференцировку нескольких типов клеток мезенхимного происхождения.
4. Изучить взаимодействие ламина А/С с сигнальным путем Notch.
5. Изучить влияние тканеспецифичной мутации в гене *LMNA* на изменение экспрессионного профиля кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с *LMNA* мутацией по сравнению с кардиомиоцитами от здоровых доноров.
6. Изучить влияние тканеспецифичной мутации в гене *LMNA* на изменение

электрофизиологических свойств кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с *LMNA* мутацией по сравнению с кардиомиоцитов от здоровых доноров.

Научная новизна работы

Использование в настоящей работе в качестве клеточных моделей нескольких типов клеток мезенхимного происхождения, а также индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), дает возможность ближе подойти к расшифровке тканеспецифичного механизма развития ламинопатий. Широкий спектр мутаций в гене *LMNA*, в свою очередь, является удобным инструментом для воссоздания картины заболевания. Мы показали, что действие той или иной *LMNA* мутации может зависеть от активности сигнального пути Notch, что также отражает и подтверждает факт взаимодействия Notch и ламин А-типа. Получены новые данные о свойствах кардиомиоцитов, полученных из ИПСК пациента с *LMNA* R249Q мутацией, на электрофизиологическом и экспрессионном уровне: мутация приводит к повышению кардиогенного потенциала ИПСК, в то же время, КМЦ с данной мутацией характеризуются замедлением кинетики потенциал-зависимого сердечного натриевого канала Nav 1.5.

Положения, выносимые на защиту

1. Наблюдается нарушение процесса мышечной дифференцировки первичных сателлитных клеток мышцы и клеток линии C2C12 при действии мутаций *LMNA* G232E и *LMNA* R571S.
2. Наблюдается подавление процесса адипогенной дифференцировки совместно со снижением активности сигнального пути Notch при действии мутации *LMNA* R482L.
3. Наблюдается противоположный эффект мутации *LMNA* R527C на активность сигнального пути Notch и остеогенную дифференцировку в мезенхимных клетках сердца человека и интерстициальных клетках аортального клапана человека.
4. Влияние ламин А-типа на дифференцировку клеток осуществляется в кооперации с сигнальным путем Notch, которое носит тканеспецифичный характер и может зависеть от конкретного направления дифференцировки.
5. Кардиомиоциты, полученные в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с *LMNA* R249Q мутацией, характеризуются измененным экспрессионным профилем.
6. Кардиомиоциты, полученные в ходе кардиогенной дифференцировки индуцированных

плюрипотентных стволовых клеток с *LMNA* R249Q мутацией, характеризуются измененными электрофизиологическими свойствами по сравнению с кардиомиоцитами, полученными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от здорового донора.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 9 работ: 6 научных статей в журналах, индексируемых системами WoS и/или Scopus, и 3 тезиса в материалах международных конференций.

Основные положения и научные итоги диссертации были изложены в докладах на научных конференциях: European Society of Cardiology (ESC) Congress 2017 (Барселона, Испания. 26-30 Августа 2017); 5th Frontiers in CardioVascular Biology 2018 (Вена, Австрия., 20-22 апреля 2018); XXVI Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus 2019 (Дижон, Франция, 20-23 Мая 2019); The Notch Meeting XI (Афины, Греция, 6–10 Октября 2019); I Всероссийский конгресс с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования» (Кемерово, Россия. 3-7 ноября 2019).

Список статей, опубликованных в журналах, индексируемых системами WoS и/или Scopus:

1. **Перепелина, К.И.**, Смолина, Н.А., Забиник, А.С., Дмитриева, Р.И., Малашичева, А.Б., Костарева, А.А. 2017. Влияние мутаций в гене *LMNA* на миогенную дифференцировку первичных сателлитных клеток и клеток линии C2C12. *Цитология* 59 (2): 117–124.
2. **Perepelina, K.**, Dmitrieva, R., Ignatieva, E., Borodkina, A., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2018. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling. *Biochem. Cell Biol.* 96, 342–348.
3. **Perepelina, K.**, Klauzen, P., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2019. Tissue-Specific Influence of Lamin A Mutations on Notch Signaling and Osteogenic Phenotype of Primary Human Mesenchymal Cells. *Cells* 8, 266.
4. **Perepelina, K.**, Kostina, A., Klauzen, P., Khudiakov, A., Rabino, M., Crasto, S., Zlotina, A., Fomicheva, Y., Sergushichev, A., Oganessian, M., Dmitriev, A., Kostareva, A., Di Pasquale, E., Malashicheva, A., 2020. Generation of two iPSC lines (FAMRCi007-A and FAMRCi007-B) from patient with Emery–Dreifuss muscular dystrophy and heart rhythm abnormalities carrying genetic variant *LMNA* p.Arg249Gln. *Stem Cell Res.* 47, 101895.
5. Malashicheva, A., **Perepelina, K.**, 2021. Diversity of Nuclear Lamin A/C Action as a Key to Tissue-Specific Regulation of Cellular Identity in Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–18.

6. **Perepelina, K.**, Zaytseva, A., Khudiakov, A., Neganova, I., Vasichkina, E., Malashicheva, A., Kostareva, A., 2022. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc. Med.* 932956.

Тезисы:

7. **Perepelina, K.**, Kostareva, A., Malashicheva, A. 2017. Lamin A/C mutations influence differentiation of cardiac stem cells through interacting with Notch and Wnt pathways. *European Heart Journal.* 38, Issue suppl_1, ehx501.40.
8. **Perepelina, K.**, Dmitrieva, R., Kostareva, A., Malashicheva, A. 2018. Lamin A/C mutation associated with mandibuloacral dysplasia influences osteogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling. *Cardiovascular Research*, volume 114, issue suppl_1, 1 pages S5.
9. **Perepelina, K.**, Klauzen, P., Kostareva, A., Malashicheva, A. 2019. Lamin A mutations influence Notch signaling and the osteogenic phenotype of human primary mesenchymal cells in a tissue-specific manner. *Biopolymers and cell*, volume 35 (3) p. 198.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ядерные ламины

У позвоночных животных ядерные ламины – белки с молекулярной массой 60-80 кДа, которые относятся к семейству промежуточных филаментов V типа. Существует две группы ламин, тип А и тип В, которые вместе с белками внутренней ядерной мембраны образуют жесткую структуру – ядерную ламину, локализованную под внутренней ядерной мембраной клетки (Рисунок 1).

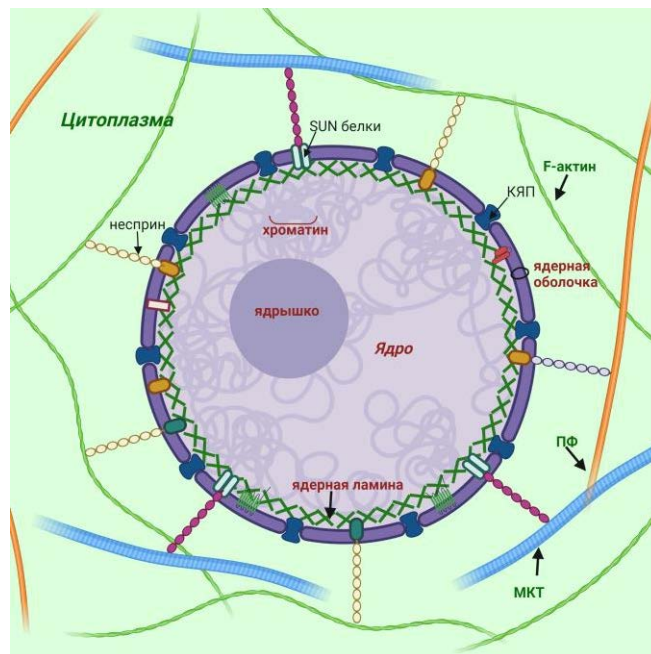


Рисунок 1. Пространственное положение ядерной ламины и ее взаимодействие с другими структурами клетки (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Ламины А и В-типа кодируются разными генами. Ген *LMNA* расположен на 1 хромосоме и кодирует ламины А типа: А, С, С2 и АΔ10 изоформы. Эти изоформы образуются путём альтернативного сплайсинга. Ламин В типа включает в себя изоформы В1, В2 и В3. Ламин В1 кодируется геном *LMNB1*, расположенным на 5 хромосоме, а ламины В2 и В3 – геном *LMNB2*, расположенным на 19 хромосоме. Ламины А и В-типа отличаются по паттерну экспрессии, характеру посттрансляционных модификаций и клеточной локализации. Важно отметить, что экспрессия ламин А-типа связана с процессом клеточной дифференцировки. Ламины А-типа отсутствуют в ранних эмбрионах, но экспрессируются в клетках-предшественниках клеточной линии и в терминально-дифференцированных клетках, при этом ламины В-типа экспрессируются повсеместно и на всех этапах развития. Таким образом, возникло предположение, что ламины В-типа определяют жизнеспособность организма в то время, как ламины А-типа имеют более специализированные функции. Более того, уровень экспрессии ламин А/С варьирует в разных

тканях (Gruenbaum and Foisner, 2015).

1.2 Структура, созревание и сборка ламина A/C

Как и все белки промежуточных филаментов, ламины содержат три структурных домена: центральный α -спиральный стержневой домен, короткий глобулярный аминотерминальный «головной» домен и длинный карбокситерминальный «хвостовой» домен. Центральный домен ламинов включает три спиральных сегмента (1A, 1B и 2), соединенные короткими линкерами L1 и L12 (Ahn et al., 2019). Ламины имеют несколько отличий от цитоплазматических IF: 1) они содержат 42 дополнительных аминокислоты в своем стержневом домене; 2) у них более короткий головной домен; и 3) их карбокситерминальный «хвостовой» домен содержит сигнал ядерной локализации (NLS), который необходим для их ядерного транспорта после синтеза в цитоплазме, иммуноглобулиноподобный (Ig-) домен, сайт связывания хроматина, и мотив СааХ (за исключением ламина С) (где С - цистеин, а - алифатическая аминокислота и Х - любая аминокислота) (Gruenbaum and Foisner, 2015; Wu et al., 2014) (Рисунок 2).



Рисунок 2. Структурная организация ламина A/C (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Ламин С транслируется как зрелый белок без множественных посттранслируемых модификаций, как в случае ламина А-типа, и не имеет 98 аминокислот с мотивом СааХ. Ламин А-типа экспрессируется в клетках в виде преламина, который претерпевает множественные посттрансляционные модификации карбокситерминального «хвостового» домена. На первом этапе процессинга преламина А фермент фарнезилтрансфераза (FTase) добавляет фарнезильную группу к С-концевому цистеину. Затем три остатка (aaX) отщепляются с помощью металлопротеиназы цинка Zmpste24 (FACE1) или фермента, RAS1 (Rce1). На следующем этапе С-концевой цистеин карбоксиметилируется изопренилцистеинкарбоксилметилтрансферазой (ICMT). Наконец, фермент Zmpste24 расщепляет последние 15 С-концевых аминокислот ламина А, тем самым удаляя карбоксифарнезилированный и метилированный цистеин (Adam et al., 2013; Corrigan et al., 2005; Fisher et al., 1986; Wu et al., 2014). На рисунке 3 представлены последовательные стадии процессинга преламина А во время созревания.

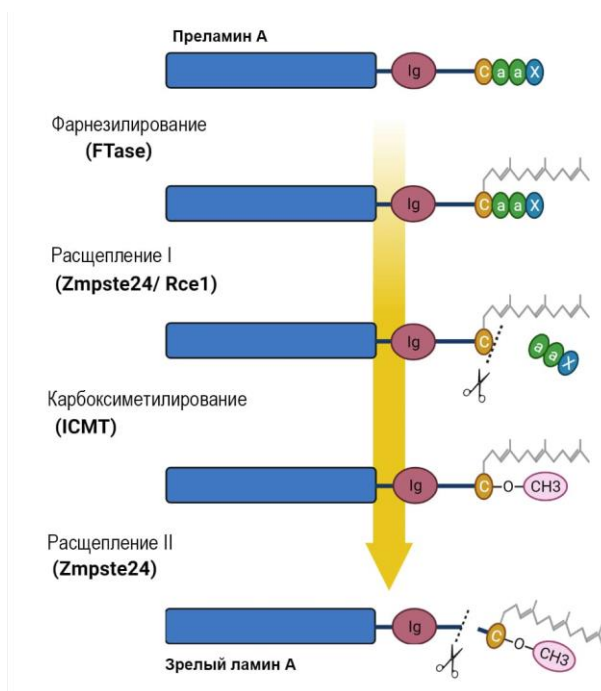


Рисунок 3. Последовательные стадии процессинга преламина А (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Известны и другие типы посттрансляционных модификаций ламин, такие как сумоилирование, убиквитилирование, ацетилирование и фосфорилирование. Эти модификации, очевидно, играют важную роль в регуляции транслокации ламин во время клеточного цикла (Donnalaja et al., 2020; Prokosimer et al., 2009). Фосфорилирование ламин участвует во многих клеточных процессах. На сегодняшний день некоторые исследования показали, что фосфорилирование способствует взаимодействию между ламинами В-типа и гистоном H2A / H2B у *Drosophila* (Mattout et al., 2007). В клетках млекопитающих два специфических сайта, фланкирующих центральный домен ламин, фосфорилируются циклин-зависимой киназой (CDK) - 1. Этот этап необходим для разборки ламин на димеры во время митоза (Chaffee et al., 2014; Naetar et al., 2017). Более того, фосфорилирование способствует динамическому взаимодействию ламин с другими белками, а также растворимости ламин А/С и образованию ламинной сети. Примечательно, что все эти процессы могут быть активированы/инактивированы, поскольку фосфорилирование является обратимой модификацией (Kochin et al., 2014; Liu & Ikegami, 2020). По-видимому, фосфорилирование ламин играет роль в модуляции активности энхансеров. Было показано, что S22-фосфорилированные ламин соединяются с активными сайтами геномных энхансеров, и это взаимодействие нарушается в прогероидных клетках (Ikegami et al., 2020). Сумоилирование, как было показано, вносит вклад в нормальное функционирование ламин А/С, а также в регуляции его сборки (Kim et al., 2011). Было показано, что мутантный ламин А/С (E203G и E203K) приводит к снижению уровня сумоилирования ламин в фибробластах и повышенной гибели клеток (Zhang & Sarge, 2008).

Основной структурной единицей филаментов ламина А/С является спиральный димер, образующийся в результате взаимодействия двух центральных стержневых доменов белков ламина. Эти димеры соединяясь голова к хвосту образуют протофиламенты, которые могут быть объединены в различных конфигурациях с образованием ламинарных филаментов толщиной 10 нм (Gruenbaum and Foisner, 2015; Herrmann and Aebi, 2004; Prokocimer et al., 2009). Структура «хвостового» домена ламина подобна иммуноглобулину и может опосредовать специфические межмолекулярные взаимодействия с другими белками (Donnalaja et al., 2020) (Рисунок 4).

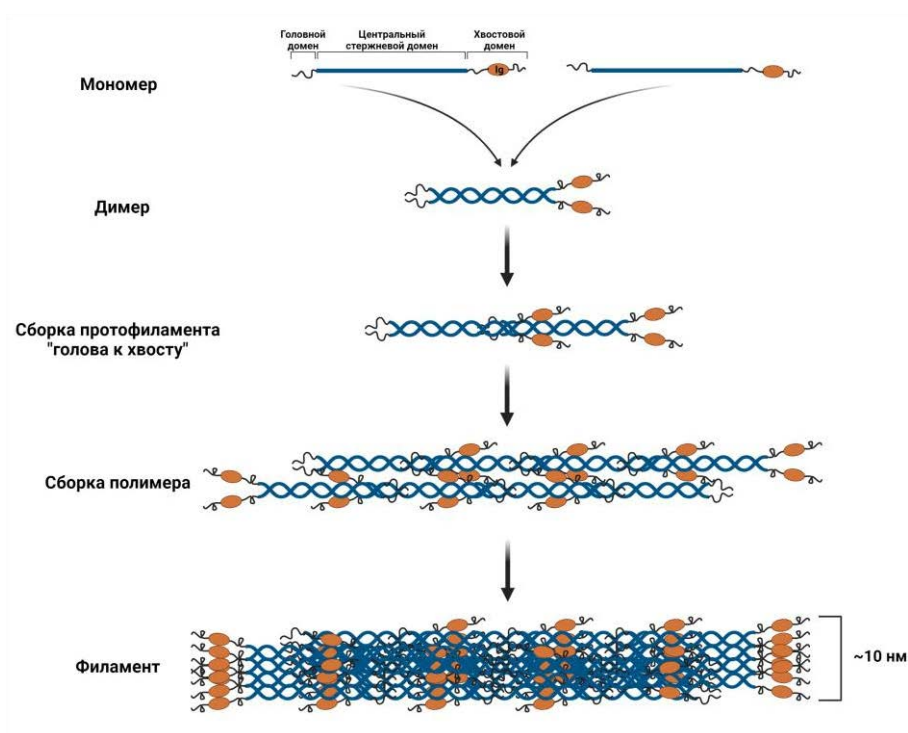


Рисунок 4. Этапы сборки филамента ламина А/С (Malashicheva and Perepelina, 2021).

1.3 Ламин А/С-ассоциированные белки

Ламины А-типа выполняют множество функций клетки, от стабилизации формы ядра до участия в более сложных процессах (таких как клеточная пролиферация, миграция, сигнальная трансдукция, клеточная дифференцировка и другие) благодаря широкому спектру ламин-ассоциированных белков (Enyedi and Niethammer, 2017; Gruenbaum and Foisner, 2015; Karoutas and Akhtar, 2021; Naetar et al., 2017).

Ламин А/С-ассоциированные белки делятся на три основные группы: (1) белки, обеспечивающие механическую поддержку ядра; (2) компоненты сигнальной системы клетки; (3) белки, регулирующие экспрессию генов и организацию хроматина (Gruenbaum & Foisner, 2015; Martino et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Среди ламин А/С-ассоциированных белков отдельно стоит выделить эмерин, LAP (leucine-rich

repeats and PDZ domains) и MAN1 белки. LAP2, эмерин и MAN1 (называемые белками LEM) содержат специальный домен из 40 аминокислотных остатков, называемый доменом LEM, который взаимодействует с фактором BAF (the barrier to autointegration factor), ДНК-связывающим фактором, участвующим в организации структуры хроматина и сборке ядерной оболочки. Существуют белки LEM, у которых отсутствует трансмембранный домен, и поэтому они локализованы в нуклеоплазме или цитоплазме (Brachner and Foisner, 2011). Помимо BAF-опосредованного влияния на структуру хроматина, ламины взаимодействуют с эпигенетическим регулятором ING (inhibitor of growth), который связывается с коровыми гистонами, деацетилазами и гистон-ацетилтрансферазами, а также с медиаторами эпигенетической регуляции. Более того, ламин A/C также может напрямую взаимодействовать с хроматином, связывая специфические области хроматина, называемые ламин-ассоциированными доменами (lamina-associated domains – LADs), на периферии ядра (Shevelyov and Ulianov, 2019) (Рисунок 5).

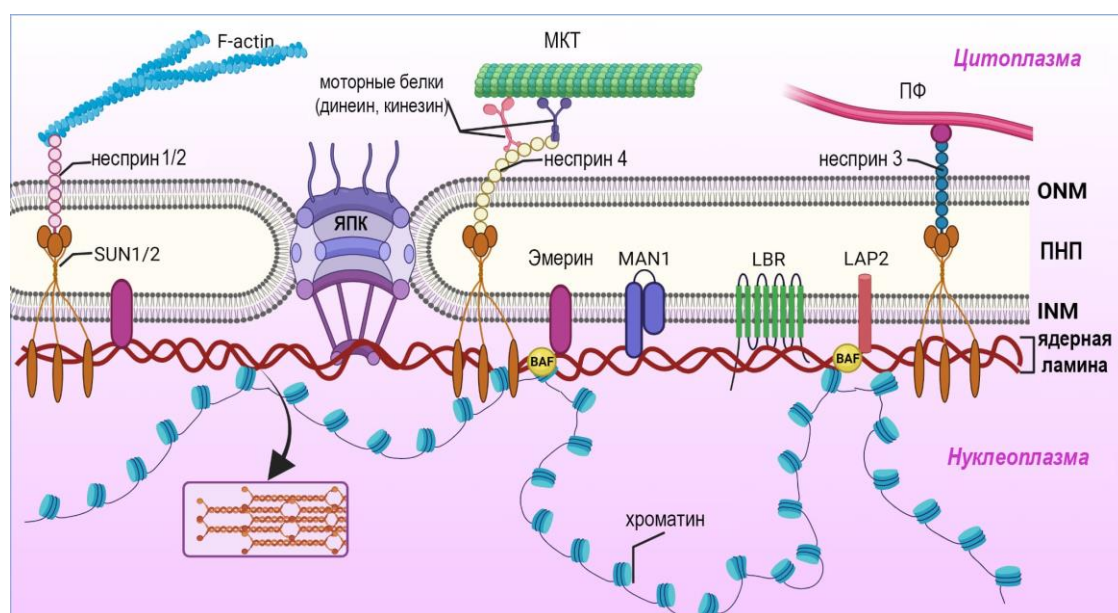


Рисунок 5. Взаимодействие ядерной ламины с белками ядерной оболочки и хроматином. INM – внутренняя ядерная мембрана; ONM – внешняя ядерная мембрана; ЯПК – ядерно-поровый комплекс; F-actin – филаментозный актин; МКТ – микротрубочки; ПФ – промежуточные филаменты; ПНП – перинуклеарное пространство (Malashicheva and Perepelina, 2021).

SUN и KASH белки являются важными компонентами ядерной мембраны, локализованными в INM (inner nuclear membrane – внутренняя ядерная мембрана) и ONM (outer nuclear membrane – внешняя ядерная мембрана) соответственно. SUN белки взаимодействуют непосредственно с ламин A/C. В то же время KASH белки связываются с основными компонентами цитоскелета, включая актиновые филаменты (через несprin-1 и -2), промежуточные филаменты (через несprin-3) и микротрубочки (через кинезиновые и динеиновые моторные белки, взаимодействующие с несприн-1, -2, -4 и KASH5) (Haque et al., 2006). Таким образом, SUN и KASH белки, несприны, совместно с ламин A/C образуют белковый комплекс, называемый комплексом LINC (linker of

nucleoskeleton and cytoskeleton), который является связующим звеном между ядром и цитоплазматическим цитоскелетом. Таким образом, через LINC комплекс возможна передача механической силы в ядро, действующей на клетку снаружи, что играет важную роль во время миграции клеток (Lee and Burke, 2018).

Кроме того, к ламин A/C-ассоциированным белкам можно отнести белки, регулирующие активность важных сигнальных путей в клетке, таких как Rb/E2F, Wnt/ β -катенин, TGF β , SMAD и MAPK (Gerbino et al., 2018; Worman, 2018).

1.4 Участие ламина A/C в тканеспецифической регуляции дифференцировки клеток

1.4.1 Роль ламина A/C в передаче механических сигналов, опосредующих дифференцировку клеток.

В настоящее время роль ламина A/C в механотрансдукции считается несомненно важной для регулирования жизненно важных процессов в клетках, включая миграцию, гомеостаз, рост и клеточную дифференцировку (Donnaloja et al., 2020; Martino et al., 2018). Во время механотрансдукции в клетке происходят преобразования механических сигналов в биологический ответ, что позволяет клетке адаптироваться к внешней среде. В этом случае ламин A/C служит механосенсором, получая внешние стимулы от внеклеточного матрикса (ВКМ), а затем преобразуя их во внутренние биологические реакции. Таким образом, ламинины являются медиаторами, помогающими клеткам адаптироваться к изменяющейся среде (Guilluy et al., 2014; Isermann and Lammerding, 2013; Martino et al., 2018; Osmanagic-Myers et al., 2015).

Первые сведения о том, что внешняя механическая сила может влиять на клеточные процессы, сопровождающиеся деформацией ядра, были получены Maniotis и его коллегами в 1990-х годах (Maniotis et al., 1997). С тех пор накапливались знания о механизмах, лежащих в основе передачи сигнала из экзогенной среды через цитоплазму в ядро.

ВКМ включает множество компонентов (белки, гликозаминогликаны и протеогликаны), которые определенным образом воздействуют на поверхность клетки. Наиболее распространенными из них являются коллаген, ламинин и фибронектин (Рисунок 6). Состав ВКМ уникален для отдельной ткани и может изменяться в ответ на изменение окружающей среды, особенно в случае заболевания (Bonnans et al., 2014). Механический сигнал от ВКМ передается трансмембранным белкам интегринам, которые выполняют сенсорную роль. Интегрины опосредуют преобразование механических стимулов в биохимические сигналы. Интересно, что в зависимости от количества и типа интегринов клетки могут реагировать по-разному (Israeli-Rosenberg et al., 2014). За счет белков, таких как талин, α -актинин и винкулин, образующих комплекс фокальной адгезии (ФАК), интегрины связываются с цитоскелетом. Белки ФАК определяют силу

взаимодействия между интегринами и F актином, который является общим компонентом цитоскелета (Chin et al., 2019). Затем сигнал передается через комплекс LINC к ядерным ламинам, основным сенсорам механотрансдукции (Рисунок 6).

Важность ламина А/С в механотрансдукции была подтверждена в исследованиях, где клетки, лишенные ламина А/С или экспрессирующие мутантный ламин, были неспособны напрямую передавать внешние силы в ядро (Poh et al., 2012).

Несмотря на идентификацию спектра молекулярных компонентов, участвующих в механотрансдукции, остается совершенно неизвестным как эти компоненты взаимодействуют и адаптируются друг к другу, при определении судьбы стволовых клеток во время дифференцировки. Считается, что процесс дифференцировки является механочувствительным, и судьба клетки может определяться типом и физической силой внешних стимулов. Во время клеточной дифференцировки ламины А-типа получают информацию об изменении микроокружения от близлежащих клеток и ВКМ через цитоскелет. Это приводит к перестройке структур хроматина, а также конформационным изменениям ядерных белков, таких как факторы транскрипции и компоненты сигнальных путей. Предполагается, что эти преобразования опосредуют конформационные изменения взаимодействия участков хроматина с ядерной ламиной, что приводит к активации/репрессии генов, связанных с дифференцировкой (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Swift et al., 2013).

Физические свойства тканей являются важным фактором, определяющим судьбу клеток. Некоторые исследователи выявили корреляцию между жесткостью субстрата и интенсивностью тканеспецифической транскрипции гена *LMNA*. Например, Нео и его коллеги продемонстрировали, что слабые внешние стимулы способствуют развитию адипогенного фенотипа мезенхимальных стволовых клеток (МСК), при этом наблюдается ингибирование продукции ламина А/С (Нео et al., 2016). Другие авторы обнаружили, что стимулы средней силы побуждают МСК дифференцироваться в направлении миоцитов, что сопровождается повышением экспрессии ламина А/С (Engler et al., 2006; Swift et al., 2013). Высокий уровень экспрессии ламина А/С в твердых тканях (таких как кость) стабилизирует ядро от механического стресса. В то же время мягкие ткани, такие как жир, характеризуются низким уровнем экспрессии ламина А/С. Было продемонстрировано, что нокдаун ламина А/С усиливает дифференцировку МСК на мягком матриксе, что способствует развитию жирового фенотипа. Напротив, избыточная экспрессия ламина А/С усиливает дифференцировку клеток на жестком матриксе в направлении костного фенотипа (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Swift et al., 2013). Кроме того, сверхэкспрессия ламина А/С приводит к ингибированию ремоделирования хроматина, а также к активации других процессов, таких как экспрессия белков, связанных со стрессом, участвующих в дифференцировке клеток, и регулятора транскрипции белка YAP1, участвующего в пролиферации клеток и подавлении сигнального пути Hippo (Swift et al., 2013).

Таким образом, через адгезионные белки и сеть цитоскелета ВКМ передает в ядро информацию о микросреде для того, чтобы стабилизировать правильную форму и жесткость ядра с помощью стабилизации количества ламин. Высокая экспрессия ламина А/С защищает все компоненты ядра от сильного физического давления, исходящих от жесткого ВКМ, например, как в костной ткани. Этот механизм отражает механическую теорию роли ламина А/С в клетках (Osmanagic-Myers and Foisner, 2019) (Рисунок 6).

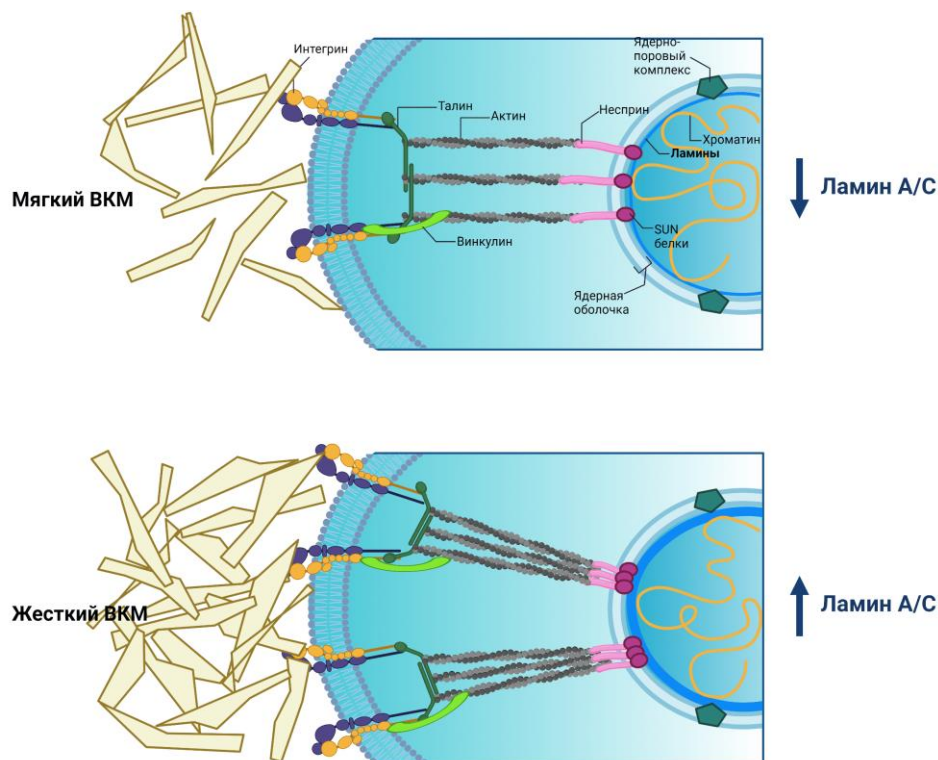


Рисунок 6. Регуляция экспрессии ламина А/С посредством механотрансдукции (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Некоторые исследователи продемонстрировали важность Ig-домена ламина А/С в изменениях, связанных со стрессом, с точки зрения перестройки ламин. В ответ на стресс электростатическое взаимодействие между положительно заряженным Ig-доменом и отрицательно заряженными участками стержневого домена соседнего ламина нарушается, что приводит к реорганизации ламин (Makarov et al., 2019).

Таким образом, уровень экспрессии ламина А/С определяет тканеспецифическую дифференцировку клеток. Механические сигналы, поступающие из ВКМ, могут направлять ламин к правильной стабилизации генома в ответ на механический стресс и тканеспецифическую экспрессию генов во время дифференцировки клеток. Эти события необходимы для поддержания формы ядра и предотвращения разрушения ДНК.

1.4.2 Роль ламина A/C в регуляции организации хроматина и экспрессии генов

Геномная ДНК в ядре эукариот, как известно, широко упакована в хромосомы, каждая из которых занимает определенную область, называемую хромосомной территорией (Cremer & Cremer, 2010). По транскрипционной активности хроматин делится на эухроматин, который включает большинство активно экспрессирующихся генов, и гетерохроматин, включающий транскрипционно неактивные гены. Гетерохроматин в основном занимает периферию ядра, в то время как эухроматин локализован во внутренней части ядра. Кроме того, гетерохроматин подразделяется на конститутивный гетерохроматин, который локализован в перицентромерных и субтеломерных областях хромосом, и факультативный гетерохроматин, локализованный в плечах хромосом (Lieberman-aiden et al., 2009; Ou et al., 2017). Было показано, что гетерохроматин связывается с ламинем A/C, образующим ядерную ламину, в то время как эухроматин связан с небольшим количеством нуклеоплазматических ламинов А-типа. Считается, что ламины А-типа регулируют репрессивное состояние генов, включенных в факультативный гетерохроматин (Bitman-Lotan and Orian, 2021; de Leeuw et al., 2018; Gruenbaum and Foisner, 2015). Эта трехмерная организация хроматина способствует регуляции экспрессии генов и поддержанию репрессии генов, включенных в гетерохроматин.

В настоящее время множество методов, таких как микроскопия сверхвысокого разрешения (Cremer et al., 2017; Ricci et al., 2017), методы захвата хромосом (Dekker et al., 2002) и иммунопреципитация хроматина (ChIP) позволяют более глубоко изучить трехмерную ядерную архитектуру (Collas, 2010; Oldenburg & Collas, 2016). Прямые взаимодействия хроматина с ламинем A/C были идентифицированы с использованием ДНК-аденин-метилтрансферазы (DamID) (Van Steensel & Henikoff, 2000; Guelen et al., 2008) и методов иммунопреципитации хроматина (Lund et al., 2014; Lund et al., 2015). Эти области теперь широко известны как ламин-ассоциированные домены (LADs). Приблизительно 30-40% генома занято LADs, которые содержат различные гены в репрессивном состоянии в соответствии с конкретным типом клеток. Более того, было высказано предположение, что ламин A/C, расположенный внутри ядра, а также периферический ламин A/C, участвуют в репрессии генов (Naetar et al., 2017). Подобно гетерохроматину, существуют факультативные и конститутивные LAD (fLAD и cLAD соответственно). Набор cLAD очень идентичен в клетках разного происхождения. Напротив, fLAD уникальны для разных типов клеток (Melcer and Meshorer, 2010). В ходе нескольких исследований было продемонстрировано, что fLADs пространственно расположены тканеспецифичным и зависимым от стадии эмбрионального развития способами (Poleshko et al., 2019, 2017; Robson et al., 2016). Недавние исследования, проведенные на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК), несущих тканеспецифическую мутацию в гене *LMNA*, подтвердили этот факт и определили, что разрушение

связей ламин-хроматин происходит в областях с определенными характеристиками. Используя три типа клеток таких как кардиомиоциты (КМЦ-ИПСК), адипоциты (АДЦ-ИПСК) и гепатоциты (ГПЦ-ИНСК), полученные из ИПСК с одной из двух кардиоспецифичных мутаций *LMNA* (T10I и R541C), было установлено, что LADs имеют клеточно-специфическую организацию. Более того, кардиоспецифические мутации *LMNA* оказывают более губительное действие на КМЦ-ИПСК по сравнению с АДЦ-ИПСК и ГПЦ-ИНСК (Shah et al., 2021).

Во время митоза делящиеся клетки претерпевают высвобождение факторов транскрипции и реорганизацию хроматина, сопровождающуюся перестройкой LADs. Интересно, что эти специфичные для клеточного типа изменения могут быть реконструированы после митоза (Shevelyov and Ulianov, 2019). Молекулярные механизмы поддержания клеточно-специфической ориентации LADs остаются неизвестными. Кроме того, не совсем ясно за счет каких взаимодействий и с помощью каких компонентов хроматин прикрепляется к ядерной ламине.

Известно, что множественные взаимодействия генома и ядерной ламины вдоль больших участков LAD зависят от посттрансляционных модификаций гистонов. Poleshko с коллегами показали, что H3K9me2 метка принимает участие в трехмерной пространственной организации гетерохроматина на периферии ядра, и повторно взаимодействует с формирующейся ядерной ламинной после митоза (Poleshko et al., 2019). Кроме того, метки H3K27me3, а также сайты связывания CTCF фланкируют LAD, опосредуя их прикрепление к ядерной оболочке (Harr et al., 2015).

Помимо ламина А, участвующего в организации хроматина, белки внутренней ядерной мембраны могут связывать участки генома с ядерной пластинкой, что приводит к репрессии генов. Было показано, что белок внутренней ядерной мембраны LBR связан с модификацией гистона H3K9me3 через гетерохроматин-связывающий белок 1 (HP1) (Hirano et al., 2012). Эмерин способен взаимодействовать с HDAC3, иницируя его каталитическую активность (Demmerle et al., 2012). Белок LAP2β играет критическую роль в организации генома, экспрессии генов и процессе дифференцировки посредством взаимодействия с АТФ-зависимым комплексом ремоделирования хроматина BAF (комплекс SWI/SNF у млекопитающих) (Margalit et al., 2007). Больше примеров участия белков внутренней ядерной мембраны в регуляции архитектуры хроматина можно найти в ранних обзорах (Cai et al., 2001; Zuleger et al., 2011).

Процессы поддержания стволовых клеток в плюрипотентном состоянии, а также их решение дифференцироваться в определенном направлении регулируются с помощью сложных внутриклеточных программ. Эти программы могут быть реализованы посредством изменений активности факторов транскрипции, конформационных изменений в организации хроматина, активности эпигенетических регуляторов и многих других событий. В этом отношении стоит отметить исключительную роль ламина А/С. Во время дифференцировки клеток происходит

пространственное перемещение геномных регионов по направлению ламине или от нее. Таким образом, гены, не относящиеся к дифференцировке, взаимодействуют с пластинкой и переходят в репрессивное состояние. В то же время гены, связанные с дифференцировкой, не прикрепленные к ламине, доступны для их экспрессии, что способствует дальнейшему определению клеточной идентичности (Bitman-Lotan and Orian, 2021) (Рисунок 7).

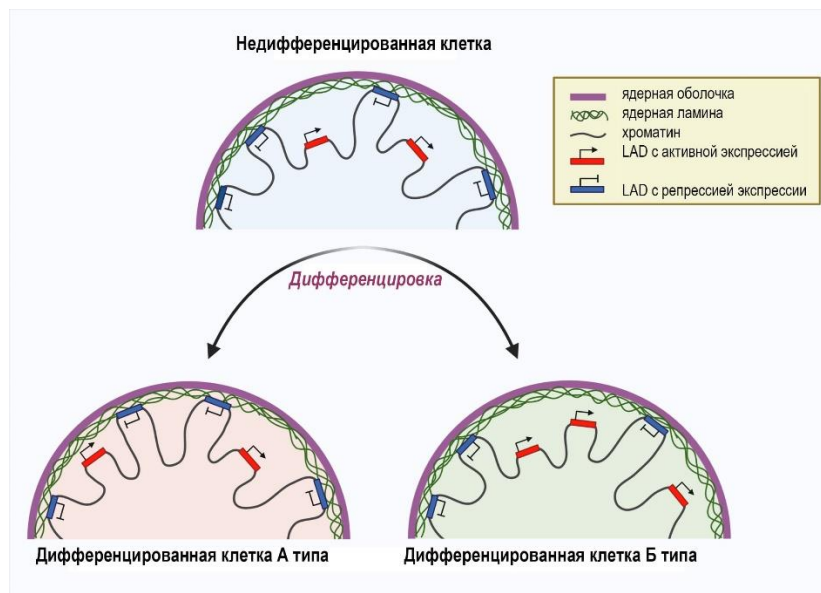


Рисунок 7. Изменение пространственных взаимодействий ламин-хроматин в процессе клеточной дифференцировки (Malashicheva and Pererelina, 2021).

Активная роль ламина A/C в идентичности стволовых клеток и дифференцировке клеток изучалась в нескольких исследованиях. Например, в процессе миогенеза некоторые гены в составе LAD перемещаются к ламине или от нее определенным образом, что ведет к изменению экспрессии генов (Robson et al., 2016). Ранее в нашей лаборатории было показано, что различные мутаций *LMNA* по-разному влияют на паттерн экспрессии генов во время дифференцировки ММСК (Malashicheva et al., 2015).

Помимо функций, описанных выше, ламины А-типа связываются с белком ретинобластомы pRb, активная гипофосфорилированная форма которого участвует в регуляции клеточного цикла и апоптоза, а также в процессах мышечной и адипоцитарной дифференцировки (Boban et al., 2010; Kennedy and Pennypacker, 2014). Последнюю функцию также подтверждает прямое взаимодействие ламина A/C с циклином D3 в мышечных клетках и SREBP1 — важным фактором адипоцитарной дифференцировки в преадипоцитах (Mariappan et al., 2007). Комплекс ламина A/C и эмерина также может взаимодействовать с α -катенином и тем самым определять начало адипогенеза (Boban et al., 2010). Кроме того, ламины А-типа сохраняют фактор c-Fos на периферии ядра, что приводит к подавлению транскрипционной активности фактора AP-1, хорошо известного регулятора клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза (Mirza et al., 2021). Таким образом, ламины А-типа

связаны со многими регуляторами транскрипции в ядре и могут влиять на экспрессию генов, связываясь с этими факторами или влияя на сборку основных транскрипционных комплексов.

C-концевой иммуноглобулиноподобный домен ламина A/C напрямую взаимодействует с фактором PCNA, который играет важную роль в репликации ДНК (Cobb et al., 2016; Shumaker et al., 2008). В естественных условиях экспрессия ламина A/C приводит к ингибированию PCNA и дефосфорилированию Rb, что, следовательно, инактивирует факторы транскрипции группы E2F. Это приводит к остановке клеточного цикла, подавлению репликации ДНК и запуску процесса дифференцировки. Нарушение экспрессии ламина A/C может приводить к фосфорилированию Rb комплексом циклин D - cdk4/6 и высвобождению фактора транскрипции E2F. В результате клетки не переходят к процессу дифференцировки, и активируются механизмы апоптоза (Chen et al., 2019).

Несмотря на большую актуальность исследований, посвященным расшифровке регуляторных функций ламинов, на сегодняшний день нет четкого представления о всех молекулярных механизмах, вовлеченных в процессы регуляции экспрессии генов и организации хроматина во время дифференцировки клеток. Учитывая сложность и различия отдельных клеточных механизмов регуляции дифференцировки клеток разного происхождения, необходимы дальнейшие исследования с использованием различных клеточных моделей с применением широко спектра современных методов.

1.4.3 Взаимодействие ламина A/C с сигнальными путями во время дифференцировки клеток

Помимо вышеперечисленных функций ламинов A-типа, они способны модулировать активность сигнальных молекул посредством их взаимодействия с генными регуляторами, промоторами и другими компонентами сигнальных каскадов в клетках.

Межмолекулярные взаимодействия ламина A/C с большим количеством компонентов сигнальных путей или их промежуточных соединений происходят из-за различных посттрансляционных модификаций, которым может подвергаться ламин A/C (Gerace and Taria, 2018; Maraldi et al., 2010). В целом посттрансляционные модификации ламина A/C можно подразделить на фосфорилирование, сумоилирование, фарнезилирование и карбоксиметилирование. Однако влияние этих модификаций на механизмы взаимодействия ламина A/C с другими молекулами и белками остается в значительной степени неизвестным (Andrés and González, 2009; Gerbino et al., 2018).

1.4.3.1 Сигнальный путь Wnt / β -катенин

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин играет решающую роль в дифференцировке различных

клеток посредством регуляции генов, участвующих в пролиферации и дифференцировке мезенхимальной ткани. Было показано, что β -катенин (преобразователь внутриклеточного сигнального пути Wnt/ β -катенин) способен взаимодействовать с ламин-связывающим белком эмерином, тем самым контролируя уровень экспрессии эмерина в дифференцированных клетках. Ингибирование киназы GSK3, важный шаг в активации β -катенина, необходимо для адипогенеза. Напротив, активация GSK3-киназы ведет к дифференцировке стволовых клеток в остеогенном направлении (Maraldi et al., 2011). Используя мышей с нокаутом (*Lmna* - / -), Tong и его коллеги показали, что отсутствие синтеза ламина A/C приводит к подавлению дифференцировки миогенных и остеогенных клеток, что коррелирует с увеличением содержания жировой ткани и экспрессией адипогенных маркеров, а также со сниженной активностью сигнального пути Wnt/ β -катенин (Tong et al., 2011). Участие сигнального пути Wnt/ β -катенин в инициации остеогенной дифференцировки МСК было подтверждено в нескольких исследованиях (Tong et al., 2011; Wang et al., 2017), тогда как адипогенное и хондрогенное направление дифференцировки подавлялось, когда сигнальный путь Wnt/ β -катенин был активирован (Case and Rubin, 2010; Ullah et al., 2015).

1.4.3.2 Сигнальный путь Notch

Сигнальный путь Notch является ключевым регулятором основных клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, как во взрослом организме, так и в период эмбрионального развития (Hori et al., 2013; Schwanbeck et al., 2011). Сигнальный путь Notch включает четыре рецептора Notch (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), пять лигандов (Jag-1, Jag-2, DLL1, DLL3, DLL4) и регуляторы генов. Рецепторы и лиганды – это в основном трансмембранные формы белков, которые обеспечивают взаимодействие соседних клеток друг с другом. Рецепторы Notch подвергаются последовательному протеолитическому расщеплению при связывании их с лигандом, что приводит к высвобождению внутриклеточного домена Notch (NICD) от клеточной мембраны. NICD перемещается в ядро, где он взаимодействует с факторами транскрипции, тем самым активируя экспрессию генов-мишеней (Andersson et al., 2011; Henrique and Schweisguth, 2019).

Установлено, что Notch участвует в регуляции процесса дифференцировки клеток (Bray, 2006). Более того, было показано участие сигнального пути Notch в развитии прогерии Хатчинсона-Гилфорда (HGPS) (Pereira et al., 2008). HGPS связана с экспрессией укороченной формы преламина А, называемого прогерином, накопление которого в основном приводит к аномальной форме ядра и структуре хроматина. Считается, что при этом происходит повреждение в основном мезенхимальных тканей. Scaffidi и Misteli показали, что экспрессия прогерина в человеческих МСК вызывает гиперактивацию экспрессии основных генов-мишеней сигнального пути Notch – *HEY1* и *HES1* (2008). Это способствует изменению экспрессии маркеров дифференцировки: усиленных

адипогенных и пониженных остеогенных. Однако изменений хондрогенной дифференцировки в клетках, несущих мутацию, в отличие от LMNA дикого типа не наблюдалось. В качестве возможного механизма было высказано предположение, что присутствие прогерина вызывает нарушение связи ламина А/С с фактором транскрипции SKIP, активатором генов семейства Notch, тем самым увеличивая экспрессию связанных с Notch генов внутри ядра. Кроме того, гены Notch, вероятно, могут напрямую взаимодействовать с ядерной ламиной, и их регуляция связана с эпигенетическими модификациями (Scaffidi and Misteli, 2008).

Сообщалось о влиянии различных мутаций LMNA на сигнальный путь Notch во время остеогенной дифференцировки МСК. Было высказано предположение, что взаимодействие ламина А/С с Notch может быть одним из механизмов, регулирующих дифференцировку МСК, основываясь на фактах, что тканеспецифические мутации LMNA способны влиять на активность сигнального пути Notch в МСК (Богданова и др. 2014). Таким образом, мутации в гене LMNA участвуют в функциональных изменениях сигнального пути Notch во время дифференцировки клеток.

1.4.3.3 Сигнальный путь TGF- β / Smad

Существует множество доказательств того, что сигнальный путь TGF- β /Smad участвует в костных аномалиях через нарушение процесса остеогенной дифференцировки. Smad2, как известно, взаимодействует с ламин-связывающим белком MAN1. Kondé с коллегами описали более подробно это взаимодействие с помощью структурного анализа и выявили UHM домен MAN1, участвующий в связи Smad2-MAN1 (Kondé et al., 2010). Гетерозиготная мутация в гене MAN1, приводящая к потере функции, приводит к костным аномалиям, таким как остеопойкилоз (склеротические поражения костей) с или без проявлений синдрома Бушке-Оллендорф и мелореостоза (аберрантный рост новой костной ткани на поверхности существующей кости). Эти аномальные изменения приводят к увеличению плотности костей и сверхэкспрессии TGF- β (Hellemans et al., 2004). Было показано, что MAN1 может участвовать в инактивации посредством конкуренции с факторами транскрипции за связывание с Smad2 и Smad3, и он участвует в их дефосфорилирование с помощью фосфатазы PPM1A (Bourgeois et al., 2013). Кроме того, ламин А/С может влиять на сигнальную активность TGF- β /Smad посредством взаимодействия с протеинфосфатазой 2A (Van Berlo et al., 2005). Очевидно, что для понимания того, как ламины А-типа способствуют функциональным изменениям сигнального пути TGF- β Smad, необходимы дальнейшие исследования.

1.4.3.4 Сигнальный путь MAPK (ERK)

Путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) регулирует клеточный цикл и процесс дифференцировки (Maraldi et al., 2011). Ламины А-типа опосредуют удержание c-Fos (фактора

транскрипции, который регулирует ключевые клеточные процессы, включая дифференцировку) на периферии ядра. Взаимодействие ламина А/С с фактором *c-Fos* может быть нарушено из-за фосфорилирования *c-Fos* с помощью MAPK Erk. Этот результат указывает на участие ламина А/С в активности сигнального пути MAPK (González et al., 2008). В кардиомиоцитах мышей с дилатационной кардиомиопатией, ассоциированной с мутацией *LMNA* H222P в ответ на механический стресс наблюдалась активация сигнального пути MAPK, в котором участвуют ERK1/2 и JNK киназы. Кроме того, было обнаружено, что ингибиторы этого сигнального пути предотвращают развитие кардиомиопатий, связанных с мутацией в гене *LMNA*, но не влияют на развитие мышечной дистрофии (Muchir et al., 2007).

Таким образом, ламинны А-типа связаны со многими сигнальными путями и регуляторами транскрипции в ядре, и могут влиять на экспрессию генов, связываясь с факторами транскрипции или влияя на сборку основных транскрипционных комплексов.

1.5 Ламинопатии

Ламинопатии - это группа наследственных заболеваний, вызванных мутациями в генах, кодирующих а) ядерные ламинны; б) белки, связанные с посттрансляционными модификациями ламиннов (например, ZMPSTE24); в) белки, которые взаимодействуют с ламинами (эмерин, LAP2, LBR, MAN1, несприн) и г) белки, составляющие ядерные поры (Zaremba-Czogalla et al., 2011).

За последние 20 лет было обнаружено, что большинство ламинопатий вызывается мутациями в гене *LMNA*, который кодирует ламин А/С. На сегодняшний день описано более 15 различных заболеваний, связанных с 498 мутациями в гене *LMNA* (<http://www.umd.be/LMNA/>).

Ламинопатии характеризуются широким спектром клинических фенотипов, при которых может поражаться один тип ткани, в основном мезенхимального происхождения, например липодистрофия (повреждение жировой ткани), мандибулоакральная дисплазия (повреждение костной ткани), кардиомиопатия и мышечная дистрофия (поражение сердечной ткани и скелетных мышц) (Rankin and Ellard, 2006). Есть несколько групп ламинопатий, при которых поражаются разные ткани, что приводит к перекрывающимся или системным фенотипам (Bertrand et al., 2011; Crasto and Di Pasquale, 2018; Zaremba-Czogalla et al., 2011) (Рисунок 8).

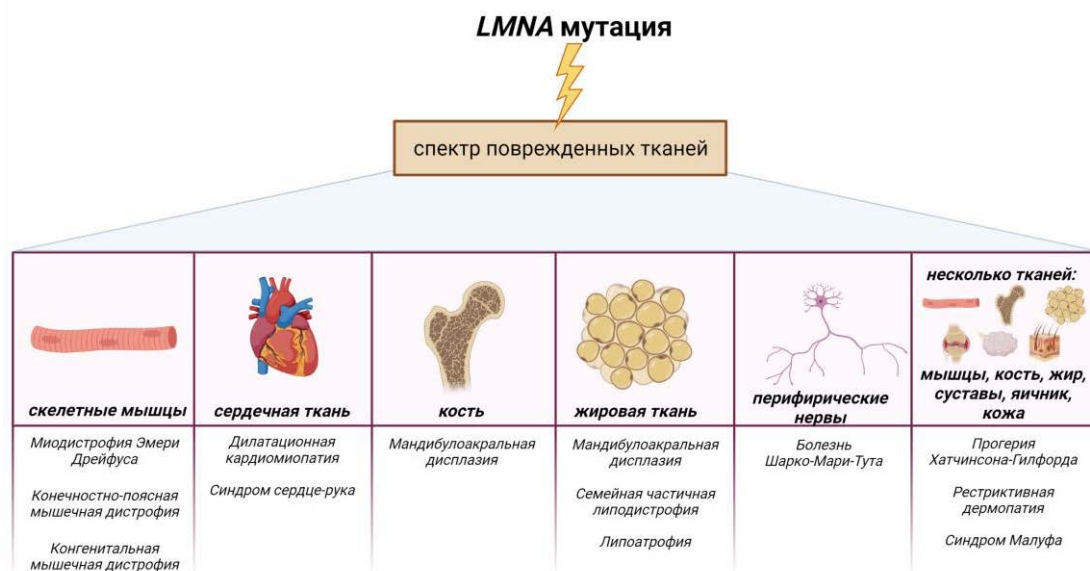


Рисунок 8. Спектр заболеваний, вызванных мутациями в гене *LMNA* (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Синдром преждевременного старения, также известный как прогерия, является одним из наиболее изученных заболеваний человека с перекрывающимися фенотипами, при котором поражаются несколько типов тканей. Патология может быть обусловлена мутациями в генах *ZMPSTE24*, *LMNA*, а также в генах, кодирующих белки, участвующими в репарации ДНК (например хеликаза RecQ – RECQL и белки эксцизионной репарации ядра (NER)) (Navarro et al., 2006). Самой известной формой прогерии является синдром Хатчинсона-Гилфорда (Rankin and Ellard, 2006; Worman et al., 2010). Это крайне редкое аутосомно-доминантное заболевание, детская форма которого характеризуется изменениями кожи и внутренних органов, вызванными преждевременным старением организма. В 2003 году был описан механизм развития данного заболевания. Мутация в гене *LMNA* вызывает замену цитозина на тимин, таким образом образуя дополнительный сайт сплайсинга в экзоне 11, что приводит к укороченной мРНК *LMNA* транскрипта. В процессе трансляции синтезируется измененная форма преламина А, в которой мотив СааХ не расщепляется с помощью фермента *ZMPSTE24*, а вместо зрелого ламина А образуется белок прогерин, который не может быть включен в ядерную ламину (Gonzalo et al., 2017).

В отличие от синдрома Хатчинсона-Гилфорда для других заболеваний, связанных с мутациями в гене *LMNA*, молекулярные механизмы патогенеза все еще плохо изучены. Большинство мутаций в гене *LMNA* приводят к нарушению сердца и скелетной мускулатуры. Среди таких заболеваний можно выделить аутосомно-доминантную и рецессивную формы мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса (МДЭД) (Worman, 2012). Было обнаружено, что заболевание связано с точечной мутацией R453W гена *LMNA*, картированного в локусе 1q 21.2-21.3 (Favreau et al., 2004b). Позже были обнаружены миссенс-мутации, G232E, Q294P и R386K, которые приводят к развитию МДЭД

(Muchir and Worman, 2007). Были описаны и другие формы ламинопатий с сердечными и мышечными фенотипами, вызванные мутациями в гене *LMNA*: дилатационная кардиомиопатия 1А (Fatkin et al. 1999) и прогрессирующая мышечная дистрофия конечностей 1В (Muchir et al., 2000). МДЭД, изолированная дилатационная кардиомиопатия и поясно-конечностная мышечная дистрофия характеризуются перекрывающимися клиническими фенотипами и дилатационной кардиомиопатией, связанной с нарушениями сердечной проводимости (Cattin et al., 2013).

Семейная частичная липодистрофия Даннигана, также известная как FPLD, представляет собой аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся потерей подкожной жировой ткани в конечностях и туловище после полового созревания и избыточным отложением жира в области головы и шеи. Всего 90% мутаций *LMNA* при этом синдроме представляют собой миссенс-мутации, локализованные в экзоне 8 (Boguslavsky et al., 2006). Было описано несколько таких мутаций, например, R482Q, R482W, G465D в экзоне 8 и R582H в экзоне 11 гена *LMNA* (Garg et al., 2001).

Мандибулоакральная дисплазия (MAD) - редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся постнатальными аномалиями костей. Развитие MAD ассоциировано с точечными мутациями в гене *LMNA*, приводящими к аминокислотным заменам (Garg et al., 2005). MAD также может быть вызвана мутациями в гене, кодирующем протеазу ZMPSTE24, участвующую в процессинге ламина А/С (Agarwal et al., 2003).

Таким образом, вышеперечисленные наиболее известные формы ламинопатий демонстрируют, что мутации в одном и том же гене *LMNA* могут приводить к развитию серьезных аномалий, характеризующихся широким спектром клинических фенотипов. Однако механизм развития этих заболеваний до сих пор полностью не изучен.

Несколько лет назад ученые предложили две гипотезы, объясняющие развитие ламинопатий: структурную гипотезу и гипотезу экспрессии генов. Согласно структурной гипотезе, мутации в гене *LMNA* вызывают, прежде всего, ослабление ядерной мембраны, что делает ее уязвимой для повреждений, приводящих к гибели клеток. Другая гипотеза основана на молекулярных механизмах и связана с тем, что ламины А-типа являются регуляторами генной экспрессии, а мутации в *LMNA* нарушают регуляторную способность ламин А-типа и способствуют развитию заболеваний (Osmanagic-Myers and Foisner, 2019). В настоящее время есть доказательства обеих гипотез. Однако интересно, что кластерный анализ мутаций *LMNA* отдает предпочтение той или иной гипотезе в зависимости от локализации мутаций *LMNA*, связанных с определенным типом ламинопатий. Таким образом, было показано, что *LMNA* мутации, расположенные выше сигнала ядерной локализации (NLS), влияют на консервативный коровой домен, необходимый для формирования и поддержания целостности ядерного цитоскелета, в то время как мутации, расположенные ниже NLS, больше влияют на регуляторные свойства ламин (Hegele, 2005). Поскольку первая группа мутаций в основном связана с большой группой мышечных дистрофий и кардиомиопатий, ученые

предположили, что причинами этих заболеваний являются, прежде всего, нарушение формирования структуры ламины и механические дефекты. Вторая группа мутаций относится к другим типам ламинопатий, в частности к прогероидным синдромам, FPLD и MAD, и, скорее всего, связана с нарушением взаимодействия ламина А/С с транскрипционными факторами и нарушением регуляции важных сигнальных путей в клетке (Cattin et al., 2013) (Рисунок 9).



Рисунок 9. Корреляция между локализацией мутаций в *LMNA* и фенотипом заболевания (Malashicheva and Perepelina, 2021).

В последнее время исследования в основном сосредоточены на изучении молекулярных механизмов развития ламинопатий (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Osmanagic-Myers and Foisner, 2019; Shah et al., 2021). Молекулярные механизмы, предложенные учеными, включают нарушения в организации гетерохроматина, внутриклеточной передачи сигнала и в процессе аутофагии, что в конечном итоге приводит к нарушению регуляции экспрессии различных генов (Wong and Stewart, 2020).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводили в научно-исследовательской лаборатории Молекулярной кардиологии и генетики научно-исследовательского института Молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия). На все работы с человеческим материалом имелось разрешение локального этического комитета ФМИЦ им. В. А. Алмазова.

2.1 Клеточные культуры

В работе использовались культуры клеток:

- Сателлитные клетки мыши
- Мышиные миобласты линии C2C12
- Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭК)
- Мезенхимные клетки сердца человека (МКС)
- Гладкомышечные клетки аорты человека (ГМК)
- Интерстициальные клетки аортального клапана человека (ИК)
- Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ИПСК)
- Клетки линии НЕК 293-T

2.1.1 Получение и культивирование сателлитных клеток мыши

Сателлитные клетки мыши выделяли из мышцы soleus самцов линии C57BL/6. Мышцу soleus изолировали и помещали в среду ДМЕМ (Invitrogen, США) с пенициллин-стрептомицином (Invitrogen, США). Изолированные мышцы помещали в 0,1%-ый раствором коллагеназы I типа (C0130, Sigma, Германия) на 90 мин при температуре 37°C. Затем мышцы центрифугировали в 15 мл пробирке при 300 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 3 мл отмывочной среды (ДМЕМ, 10% лошадиной сыворотки (ЛС), 1% антибиотика) и инкубировали в течение 5 мин. Процедуру отмывки повторяли. Дважды собранную надосадочную жидкость центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Полученный в результате центрифугирования клеточный осадок растворяли в 0,5 мл культуральной среды (ДМЕМ с добавлением 20 % ФБС, 10% ЛС, 1% эмбрионального экстракта цыпленка и 1% антибиотика).

Полученные клетки культивировали на покрытых Geltrex (Invitrogen, США) культуральных чашках при 37°C, 5% CO₂, 99% влажности. Культуральную среду меняли через день.

2.1.2 Миобласты линии C2C12

Клетки линии C2C12 культивировали в среде ДМЕМ (Invitrogen, США), с добавлением 10%

ФБС, 1% L-глутамин (Invitrogen, США) и 1% пенициллин-стрептомицин (Invitrogen, США) при 37°C, 5% CO₂, 99% влажности.

Смена культуральной среды производилась каждые двое суток. При образовании клетками монослоя производили пересев культуры с помощью 2,5-кратного раствора трипсина (Invitrogen, США), разведенный в фосфатном буфере. Клетки инкубировали с трипсином в термостате в течение 3-5 мин. Далее клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали в культуральной среде, разбивая клеточные агрегаты.

Для заморозки клетки также снимали со дна культуральной посуды с помощью трипсина и центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали клеточный осадок в 10%-ом растворе криопротектора ДМСО в ФБС. Суспензию клеток переносили в криопробирки и замораживали при температуре -80°C. На следующий день криопробирки переносили в жидкий азот (-195°C).

2.1.3 Интерстициальные клетки аортального клапана человека (ИК)

ИК выделяли из здоровых клапанов, полученных от пациентов после операции по замене аортального клапана в рамках операции, проводимой в ФМИЦ им. Алмазова. Изолированный клапан обрабатывали в 0,2%-ом растворе коллагеназы (коллагеназа А-типа IV, ≥ 160 ед/мг, Worthington Biochemical Corporation, США) как было описано ранее (Kostina et al., 2018). Полученную культуру клеток поддерживали в культуральной среде: ДМЕМ (Invitrogen) с добавлением 15% ФБС, 2 мМ L-глутамин и 100 ед/мл пенициллин-стрептомицин (Invitrogen).

2.1.4 Гладкомышечные клетки аорты человека (ГМК)

ГМК выделяли путем ферментативной обработки стенки аорты. Аорту помещали в раствор коллагеназы по протоколу, описанному ранее (Kostina et al., 2018). Аортальную ткань обрабатывали 0,1%-ым раствором коллагеназы (коллагеназа, тип III, ≥ 100 ед/мг, Worthington Biochemical Corporation, США) в течение 1 часа при 37°C. Далее, после промывания в среде ДМЕМ с добавлением 20% ФБС и антибиотика, ткань аорты измельчали на небольшие фрагменты и переносили в культуральный флакон с предварительно нанесенными на дно царапинами. Клетки культивировали в среде ДМЕМ (Invitrogen, США) с добавлением 20% ФБС (Invitrogen, США), 2 мМ L-глутамин и 100 ед/мл пенициллин-стрептомицин (Invitrogen, США).

2.1.5 Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭК)

ЭК получали из пупочной вены путем ферментативной обработки ткани (Baudin et al., 2007). Вену промывали в ФБС, заполняли 0,1%-ым раствором коллагеназы (коллагеназа II, Worthington

Biochemical Corporation, США) и инкубировали в ФСБ при 37° С в течение 10 мин. Раствор коллагеназы, содержащий клеточную суспензию центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Клеточный осадок промывали в ДМЕМ (Invitrogen, США), ресуспендировали и высевали на культуральные чашки, покрытые 0,2%-ым желатином (Sigma-Aldrich, США) в среду ЕСМ (Stem Cell, Канада). Клетки поддерживали при 37°С, 5% CO₂.

2.1.6 Мезенхимные клетки сердца человека (МКС)

2.1.6.1 Получение, культивирование и трансдукция МКС

Согласно протоколу (Smits et al., 2009) фрагмент ткани миокарда промывали в ФСБ, измельчали и инкубировали в растворе коллагеназы II (1 мг/мл) в течение 2 ч при 37°С. Ткань пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм и центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. Осадок ресуспендировали в культуральной среде (20% ЕСМ (Stem cell, Канада), 70% ДМЕМ/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), 10% ФБС (Nuclease) (Thermo Fisher Scientific, США), 1x раствор аминокислот MEM NEAA, 1% L-глутамин (Invitrogen, США), 1% пенициллин-стрептомицин (Invitrogen, США)) и высевали на чашку, покрытую 0,1%-ым желатином. Клетки поддерживали в культуральной среде при 37° С и 5% CO₂. Культуральную среду меняли каждые трое суток. При достижении клетками монослоя проводили пересев культуры с использованием 2,5-х раствора трипсина (Invitrogen, США), разведенного в ФСБ. Клетки инкубировали с трипсином в термостате в течение 3-5 мин. Затем к клеткам добавляли прогретую культуральную среду и тщательно ресуспендировали, разбивая клеточные агрегаты. Суспензию клеток центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в свежей культуральной среде. Для экспериментов клетки рассеивались на 12-луночные планшеты из расчета 60x10³ клеток на лунку.

Во время посева МКС на 12ти-луночные планшеты в среду для культивирования добавляли концентрат вирусных частиц. Через 16 ч после трансдукции клеткам меняли культуральную среду.

Иммунофенотипирование МКС проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 5 (Millipore, США) с использованием моноклональных антител против CD33, CD56, CD73, CD90, CD105, CD117, CD146, CD166 (Abcam, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

2.1.6.2 Дифференцировка МКС в адипогенном и остеогенном направлениях

Остеогенную или адипогенную дифференцировку клеток индуцировали путем замены ростовой среды на дифференцировочную.

Состав среды для проведения адипогенной дифференцировки: культуральная среда (указано выше), содержащая 0,5мМ 3-изобутил-1-метилксантин, 1мкМ дексаметазон, 1мкМ инсулин, 0,2мМ индометацин, 0,5мМ росиглитазон (все Sigma, США). Смену дифференцировочной среды с

добавлением всех дифференцировочных факторов производили каждые трое суток. Продолжительность дифференцировки составляла 14 дней.

Состав среды для проведения остеогенной дифференцировки: культуральная среда (указано выше), содержащая 50мкМ аскорбиновой кислоты, 1мкМ дексаметазона, 10мМ бета-глицеролфосфата (Sigma, США). Смену среды так же производили каждые трое суток. Продолжительность дифференцировки составляла 21 день.

2.1.6.3 Окраска МКС, дифференцированных в адипогенном направлении

Дифференцированные клетки окрашивали красителем OilRed (Sigma, США). Для этого, из культуральной посуды удаляли среду и промывали клетки ФСБ. Далее клеточный слой фиксировали раствором 4%-ного ПФА в течение 30 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой ФСБ. В лунку с клетками добавляли краситель OilRed и инкубировали в течение 30 мин. Клетки промывали дважды водой и оставляли небольшое количество воды для предотвращения пересыхания клеток.

Результаты окраски анализировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert (Zeiss, Германия). Программное обеспечение MosaiX (Carl Zeiss Microsystems, Германия) было использовано для определения количества дифференцированных клеток на лунку для каждого из условий.

2.1.7 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)

В работе использовали ИПСК линию, несущую мутацию R249Q в гене *LMNA*, которую получали с использованием набора для репрограммирования CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

В качестве контроля использовали две линии ИПСК: AD3 и WTSi004-A.

Линия AD3 была любезно предоставлена Негановой И.Э. (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия). AD3 линия была создана из неонатальных фибробластов человека (HNF) с использованием лентивирусного неинтегрирующего набора для перепрограммирования Сендай CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. HNF были приобретены у Lonza (Slough, Великобритания) и культивированы, как описано ранее (Neganova et al., 2017). AD3 линия была охарактеризована в соответствии с протоколом, опубликованным ранее (Chichagova et al., 2015), и соответствовала всем критериям плюрипотентности (Neganova et al., 2017, 2016).

Линия WTSi004-A была приобретена в Европейском банке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (EBiSC) (<https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/66540074>). Банк

EBiSC признает Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) источником индуцированной человеком плюрипотентной клеточной линии WTSIi004-A (HPSI1113i-qolg_3), которая была создана при поддержке компаний EFPIA и Европейского Союза (IMI-JU').

2.1.7.1 Получение и культивирование ИПСК

Линию ИПСК, несущую мутацию *LMNA* R249Q, получали от пациента с ранее верифицированным диагнозом миодистрофия Эмери-Дрейфуса (МДЭД) и клинически значимыми нарушениями ритма путем репрограммирования пациент-специфичных Т-лимфоцитов. Для этого проводили экспансию Т-лимфоцитов периферической крови путем культивирования в течение ночи мононуклеарной фракции крови в среде RPMI1640 Glutamax с добавлением 10% ФБС, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 200 ед. IL-2, а также магнитных частиц Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (все Thermo Fisher Scientific, США). Далее проводили магнитную сепарацию Т-лимфоцитов с помощью магнитного штатива. Для индукции репрограммирования Т-лимфоциты трансдуцировали вирусами Сендай, несущими набор репрограммирующих факторов (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Репрограммирование осуществляли на подложке из мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ) в среде hES (КО-ДМЕМ, 20% KOSR, 1% аминокислот NEAA MEM, 2 mM глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина, 55мкМ β-меркаптоэтанола, 10 нг/мл рекомбинантного человеческого bFGF) в течение 3-5 недель до образования колоний ИПСК. Образованные колонии отбирали, изолировали и переносили в лунки 6-тилуночного планшета, заранее засеянного МЭФ из расчета 250 тыс. клеток на лунку. Одну исходную ИПСК колонию переносили на одну лунку.

Затем полученные линии ИПСК были адаптированы к бесфидерным условиям культивирования. Колонии ИПСК переносили в среду Essential 8 (Thermo Fisher Scientific, США) на чашки, покрытые Geltrex. При достижении клетками 80-90% конфлюэнтности, их пассировали с использованием реагента ReLeSR (Stem Cell Technologies, Канада) в среду Essential 8, содержащую 5 мкМ ингибитора Rock киназы Y-27632 (Tocris, Великобритания). Среду меняли ежедневно. Клетки поддерживали при 37°C, 5% CO₂.

2.1.7.2 Проверка способности ИПСК к дифференцировке в клетки трех зародышевых листков

Для подтверждения плюрипотентных свойств у полученных ИПСК линий, была произведена проверка потенциала к формированию трех зародышевых листков. ИПСК дифференцировали с использованием STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (Stem Cell Technologies, Канада) согласно рекомендациям производителя. Клетки высевали на 24-луночные планшеты, предварительно

покрытые Geltrex, в среду Essential 8 с добавлением 5 мкМ ингибитора ROCK Y-27632. Через 24 часа ростовую среду меняли на соответствующую дифференцировочную среду из указанного набора; смену среды проводили раз в два дня. Далее на 5-й день для мезо- и энтодермы, и на 7-й день для эктодермы, проводили иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры, специфичные для трех зародышевых листков.

2.1.7.3 Кардиогенная дифференцировка ИПСК

Дифференцировку ИПСК в направлении кардиомиоцитов проводили путем модуляции активности Wnt сигналинга малыми молекулами согласно ранее опубликованному протоколу (Burridge et al., 2014; Lian et al., 2013) с некоторыми модификациями.

Для посева на дифференцировку ИПСК снимали со дна культуральной посуды с помощью реагента TrypLe Select (Thermo Fisher Scientific, США), суспензию клеток центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде Essential 8 (Thermo Fisher Scientific, США), с добавлением 5 мкМ ингибитора ROCK Y-27632 (Tocris, Канада). Суспензию клеток рассеивали на заранее покрытые Geltrex (Thermo Fisher Scientific, США) 12-луночные планшеты в плотности 600×10^3 клеток на лунку. Через 24 часа клеткам заменяли среду Essential 8 на свежую. Через 24 часа после смены среды Essential 8, запускали дифференцировку путем замены ростовой среды (Essential 8) на дифференцировочную (RPMI1640 GlutaMax, с добавлением B27 без инсулина, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (все Thermo Fisher Scientific, США), а 6 μ M CHIR99021 (Selleckchem, США)) и оставляли на два дня. После этого клетки держали 48 часов в среде RPMI1640 GlutaMax с добавлением B27 без инсулина и 5 μ M IWR-1 (Stem Cell Technologies, Канада). Далее среду меняли на RPMI1640 GlutaMax, с добавлением B27 без инсулина с 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США). С 6 по 21-23 день дифференцировки клетки дифференцировали в среде RPMI1640 GlutaMax, с добавлением B27 с инсулином, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США). Смену среды осуществляли раз в 2-3 дня. Метаболическую селекцию кардиомиоцитов проводили на 9-13 день дифференцировки. Для этого клетки переводили на селективную среду (DMEM без глюкозы и пирувата (Thermo Fisher Scientific, США), 4 мМ лактата натрия (Sigma Aldrich, США), 2 мМ глутамина, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США)). Во время селекции наблюдали гибель недифференцированных клеток и выживание кардиомиоцитов.

Полученные кардиомиоциты снимали со дна культуральной посуды с помощью реагента TrypLe Select в среде RPMI1640 GlutaMax с добавлением B27 и сажали на стекла, покрытые Geltrex (все Thermo Fisher Scientific, США), для дальнейших электрофизиологических исследований.

2.2 Плазмиды

Плазмида pLVTHM любезно предоставленная D. Trono (Ecole Polytechnique, Lausanne, Швейцария), была использована для создания лентивирусных векторов. Ранее в нашей лаборатории на основе данной плазмиды были сконструированы конструкции, несущие гены, кодирующие следующие белки: внутриклеточный домен Notch1 (NICD, Notch intracellular domain), ламин дикого типа (*LMNA* WT), ламин с заменой R482L (*LMNA* R482L), ламин с заменой R527C (*LMNA* R527C) (Malashicheva et al., 2015, 2007).

2.3 Производство лентивирусных частиц

Производство лентивирусных частиц осуществляли по протоколу, разработанному в лаборатории доктора Д. Троне (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Швейцария) и модифицированный в лаборатории А. Н. Томилина (Malashicheva et al., 2007).

2.4 Иммуноцитохимическая окраска клеток

Клетки на предметных стеклах фиксировали 4%-ым раствором параформальдегида в течение 12 мин при комнатной температуре. Клетки пермеабелизовали 0,5%-ым раствором тритона X-100 в ФСБ в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывали ФСБ три раза по 5 мин. Блокирование неспецифического связывания производили с помощью 1%-ного раствора БСА на ФСБ в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего удаляли раствор. Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере в течение одного часа при комнатной температуре. Рабочий раствор антител готовили в 1%-ном растворе БСА на ФСБ. После трех отмывок по 5 мин в ФСБ клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом, в течение часа в темноте при комнатной температуре, с последующей отмывкой в ФСБ три раза по 5 мин. Ядра дополнительно окрашивали раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Invitrogen, США) в течение 1 мин. Затем клетки дважды промывали в ФСБ. Стекла монтировали с помощью среды Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma, США). Визуализацию и анализ результатов иммуноцитохимии производили с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss AxioObserver Z1 с камерой AxioCam 506 на программном обеспечении Zen software (Zeiss, Германия). Первичные и вторичные антитела, используемые в работе, приведены в Таблице 1.

Примечание	Антитела	Разведение	Каталожный № (Cat #)/RRID
Плюрипотентный маркер (первичные антитела)	Goat anti-OCT4	1:200	Santa Cruz Cat# 9656, RRID:AB_653551

Плюрипотентный маркер (первичные антитела)	Mouse anti-NANOG	1:200	Millipore Cat# MABD24, RRID:AB_11203826
Плюрипотентный маркер (первичные антитела)	Mouse anti-SSEA4	1:200	R&D Systems Cat# MAB1435, RRID:AB_357704
Эктодермальный маркер (первичные антитела)	Mouse anti - β III Tubulin	1:200	R&D Systems Cat# MAB1195, RRID:AB_357520
Мезодермальный маркер (первичные антитела)	Goat anti-Brachyury	1:200	R&D Systems Cat# AF2085, RRID:AB_2200235
Энтодермальный маркер (первичные антитела)	Goat anti-GATA6	1:200	R&D Systems Cat# AF1700 RRID:AB_2108901
Кардиомиоцитарный маркер (первичные антитела)	Mouse anti-troponin T	1:200	Thermo Fisher Scientific Cat# MA5- 12960, RRID:AB_11000742
Кардиомиоцитарный маркер (первичные антитела)	Mouse Anti- Tropomyosin	1:200	Santa Cruz, Cat# sc-74480
Миогенный маркер (первичные антитела)	Mouse anti-desmin	1:200	Clone D33, DAKO M0760
Миогенный маркер (первичные антитела)	Mouse anti- Myosin Heavy Chain (MYHC)	1:200	R&D Systems Cat# MAB4470-SP
Ядерный белок ламин A/C (первичные антитела)	Mouse-Lamin A/C Monoclonal	1:200	Invitrogen, Cat # MA3-1000
Вторичные антитела	AF546	1:1000	Invitrogen
Вторичные антитела	AF488 Goat Anti- Mouse IgG	1:1000	Invitrogen Cat# A11029, RRID:AB_138404
Вторичные антитела	AF488 Donkey Anti- Goat IgG	1:1000	Invitrogen Cat# A11029, RRID:AB_2534102

Таблица 1. Антитела, используемые для иммуноцитохимического окрашивания.

2.5 Анализ экспрессии генов

Анализ экспрессии генов проводили с использованием метода ПЦР в режиме реального времени. Выделение РНК из клеток проводили с помощью набора реактивов ExtractRNA (Евроген, Россия) с последующей обработкой ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия). Реакцию ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием смеси qPCR mix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия) с геноспецифическими праймерами на приборе LC480 (Roche, Швейцария). Относительную экспрессию анализируемых генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, используя

GADPH в качестве референсного гена. Концентрацию и чистоту полученных образцов определяли при помощи спектрофотометра Nanodrop 7500 (Wilmington, США). Кроме того, проверку качества выделенной РНК осуществляли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле при силе тока 80 мА с использованием электрофоретических камер фирмы BioRad (США). Последовательности используемых праймеров представлены в Таблице 2.

Ген	Последовательность прямого/обратного праймера (5'-3')	
Последовательность праймеров к генам человека		
<i>GAPDH</i>	AATGAAGGGGTCAATTGATGG/AAGGTGAAGGTCGGAGTCA A	Референсный ген
<i>HEY1</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG/CGAAATCCCAAACCTCCGATA	Гены-мишени сигнального пути Notch
<i>HES1</i>	AGCACAGAAAGTCATCAAAG/AGGTGCTTCACTGTCAATTC	
<i>NOTCH1</i>	GTCAACGCCGTAGATGACC/ TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG	
<i>NOTCH3</i>	GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT/GGCAAAGTGGTCCAA CAGCAGC	
<i>NOTCH4</i>	GTTGTGACAGGGTTGGGACT/CAGCCCAGTGGGTATCTCTG	
<i>SLUG</i>	TCCAGACCCTGGTTGCTTCA/GAATGGGTCTGCAGATGAGC C	
<i>C-MYC</i>	TTTCGGGTAGTGGAAAACCA/CACCGAGTCGTAGTCGAGG T	
<i>CCND3</i>	TGACCATCGAAAAACTGTGC/TTGAGCTTCCCTAGGACCAG	
<i>DLL4</i>	AGGCCTGTTTTGTGACCAAG/CTCCAGCTCACAGTCCACAC	
<i>JAG1</i>	TGCCAAGTGCCAGGAAGT/GCCCCATCTGGTATCACACT	
<i>AP2</i>	GCCAGGAATTTGACGAAGTC/TGGTTGATTTCCATCCCAT	Маркеры
<i>PPARG</i>	AGCCTTCCAACCTCCCTCATGGCA/TCCGGAAGAAACCCTTG CATCCT	адипогенной дифференцировки
<i>RUNX2</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG/CGAAATCCCAAACCTCCGATA	Маркеры остеогенной дифференцировки
<i>ATF4</i>	HS00909569_g1 (TaqMan)	
<i>OPN</i>	TCACCTGTGCCATACCAGTAAA/TGGGTATTTGTTGTAAG CTGCTT	
<i>COL1A1</i>	GACCTAAAGGTGCTGCTGGAG/CTTGTTACCTCTCTCGCC A	
<i>OGN</i>	GGCAATAACACCATACCTCCC/AGGGTGGTACAGCATCAA TGT	
<i>BMP4</i>	AGCACTGGTCTTGAGTATCCTG/GCAGAGTTTTCACTGGTC	

	CC	
<i>OCT3/4</i>	GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA/CTTCTGCTTCAGGAGCTTG G	Плюрипотентные маркеры
<i>NANOG</i>	CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC/TGGAAGGTTCCCAGT CGGGTTCACC	
<i>SOX2</i>	AACCCCAAGATGCACAACCTC/GCTTAGCCTCGTCGATGAAC	
<i>TBX1</i>	GGTACTCCCAATCCTATTCTGAC/GCTGGACCAATTGTCAT GGG	Кардиогенные маркеры
<i>ISL1</i>	GCGGAGTGTAATCAGTATTTGGA/GCATTGATCCCGTACA ACCT	
<i>GATA4</i>	CGACACCCCAATCTCGATATG/GTTGCACAGATAGTGACCC GT	
<i>MEF2C</i>	CCAACCTCGAGATGCCAGTCT/GTCGATGTGTTACACCAGG AG	
<i>TrT</i>	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT/GCGGGTCTTGAGACTTTCT	
<i>MYH7</i>	TAGACACACTTGAGTAGCCCAG/CTAGCCGCTCCTTCTCTG ACT	
<i>ACTN2</i>	GAACAAGATGGAGGAGATTGCC/GATGTTGTGCTCATACTG CTTCA	
<i>FLNC</i>	GACAACCATGACTACTCCTACACT/CCGCCATAAGTCACTG TCACT	
<i>DMPK</i>	GAGACCTATGGCAAGATCGTCC/CTGAATGAAGTCTCGAGC CTCC	
<i>ILK1</i>	CCAAGATCAAGTGGCAGAGGAC/GTCCACAGGCATCTCTC CATACT	
<i>SCN5A</i>	GAGCGGCTGTGAAGATTCTGGTTC/GCCATGAACACGCAGT TGGTG	
<i>SCN4B</i>	GGCTCCTCCTTCTGTCTTAAGAG/CTGAGAGAAGCTGCATG ATCCA	
<i>TRPM4</i>	CTGCACGACGTTTCATAGTTGAC/TGTGTGCATCGCTGTCCC	
<i>HCN4</i>	CGCTGCCACCACTTCTGT/TTCAGGTGCCTTGGCGTC	
<i>PKP2</i>	GCTGCTTCCGTCCTTCTGTA/GGAGTGGTAGGCTTTGGCA	
<i>DSP</i>	GGCACCAGCAGGATGTACTA/CTCCTGGATGGTGTCTGGT	
<i>GJA5</i>	GCCAGTACTTCATCTACGGAATCT/GGATACGTAACAGTTG	

	ACCGG	
<i>JUP</i>	ACTCTGTGCGTCTCAACTATGG/AAGCCGATGGTTGCCTTG AC	
Последовательность праймеров к генам мышцы		
<i>Myomaker</i>	CCTGTGATGGGCCTGGTTTGTC/GGTTCAATCAAAGTCGGCC AGTGC	Маркеры миогенной дифференцировки
<i>Pax3</i>	CGATGGCATCCTGAGTGAGC/GCCGTGAAGGTGGTTCTGC	
<i>Myf5</i>	AAGGCTCCTGTATCCCCTCAC/TGACCTTCTTCAGGCGTCT AC	
<i>MyoD</i>	CTGCCTTCTACGCACCTGGAC/GGGCCGCTGTAATCCATCA TGC	
<i>MyoG</i>	GAGACATCCCCCTATTCTACCA/GCTCAGTCCGCTCATAGC C	
<i>Myh4</i>	GGCTGAGGAGGCTGAGGAAC/CTGGGACTCCGCGATGTCA G	
<i>Mrf4</i>	CAGTGGCCAAGTGTTTCGGATCA/CTTCTCCACCACCTCCT CCAC	
<i>GAPDH</i>	GGATCTGACGTGCCGCCTG/GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT TGC	Референсный ген

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых для ПЦР в режиме реального времени.

2.6 Статистическая обработка данных, полученных после реакции ПЦР в режиме реального времени

Для статистической обработки данных и построения графиков использовали программу GraphPad, графики строили с использованием программы Microsoft Excel. Данные в результатах представлены в виде среднего значения по всем проведённым экспериментам, указаны стандартные отклонения (SD) или ошибки среднего (SEM). Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$ (*) и $p < 0,01$ (**).

2.7 Полуколичественная ПЦР.

Для подтверждения отсутствия экзогенных факторов репрограммирования ИПСК использовали метод полуколичественной ПЦР с последующим электрофорезом амплифицированных фрагментов ДНК в агарозном геле.

Реакционная смесь включала следующие компоненты: 50 нг матрицы кДНК, 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 пМоль), 2 мкл смеси dNTP (10 мМ), 5x буфер DreamTaq Green (Thermo Fisher Scientific, США), 5 ед. Taq-полимеразы (Силекс). Последовательности праймеров указаны в Таблице 3. Реакция проводилась по следующей схеме: 95°C – 30с, 35 циклов (95°C – 30 с, Tm – 30 с, 72°C – 1 мин) и 72°C – 5 мин. ПЦР проводили с использованием прибора Applied Biosystems (США). Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном геле на TAE буфере при силе тока 80 мА.

	Ген	Последовательность прямого/ обратного праймера (5'-3')
Трансген вируса Сендай	<i>KOS</i>	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ACCTTGACAA TCCTGATGTGG
Геномная последовательность вируса Сендай	<i>SeV</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGA GTTTAAGAGATATGTATC
Ген домашнего хозяйства	<i>GAPDH</i>	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG/GTCCACCACC CTGTTGCTGTAG

Таблица 3. Последовательности праймеров, используемых для полуколичественной ПЦР

2.8 Реакция на щелочную фосфатазу

Для подтверждения плюрипотентных свойств ИПСК линий клетки окрашивали с использованием субстрата для обнаружения щелочной фосфатазы NBT/BCIP (Roche, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. Микрофотографии получали при помощи микроскопа AxioObserver.D1 (Carl Zeiss, Германия).

2.9 Определение уровня активации репортерной конструкции

Для оценки активности сигнального пути Notch использовали лентивирусный вектор на основе репортерной люциферазной конструкции 12XCSL. Плазмида 12XCSL содержит ген люциферазы, который находится под контролем минимального промотора, несущего 12 CSL-зависимых повторов. Активация гена люциферазы свидетельствует об активации CSL-зависимой транскрипции и таким образом об активации сигнального пути Notch.

Клетки рассеивали на 12-луночные планшеты, в которые вводили с помощью лентивирусной трансдукции одновременно репортерную плазмиду (12XCSL), плазмиду, несущую ген NICD, и плазмиду, несущую ген *LMNA* – дикого типа, либо с одной из исследуемых мутаций. Для определения уровня активации репортерных конструкций использовали коммерческий набор Renilla Luciferase assay systems (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Измерение

люциферазной активности производили на приборе Synergy2 (BioTek, США). В качестве контроля использовали пробы с клетками без трансдукции репортерной люциферазной конструкцией и/или без добавления люциферина.

2.10 Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp)

Эксперименты по регистрации входящего тока натрия (INa) были выполнены с использованием метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в отведении от целой клетки (whole-cell). Внутриклеточный раствор для регистрации INa (ммоль/л): 130 CsCl, 10NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.3 CsOH). При регистрации INa в раствор также добавляли 20 мкМ нифедипина для блокирования кальциевых токов. Внеклеточный раствор для регистрации INa: 140 NaCl, 1MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Глюкоза (pH 7.4 CsOH).

Стеклянные микроэлектроды изготавливались при помощи пуллера (P-1000, Sutter Instrument, США). Сопротивление электродов составляло 1,8-3,2 МОм. Получение данных и коррекция потенциалов жидкостного соединения (junction potential) проводилась с помощью усилителя Axopatch 200B и программного обеспечения Clampfit версии 10.3 (Molecular Devices Corporation, США). Токи были получены при частоте стимуляции 20-50кГц и отфильтрованы на 5 кГц с помощью аналого-цифрового преобразователя (Digidata 1440A acquisition system, Molecular Devices Corporation, США). Последовательное сопротивление компенсировалось при 75-80%. Чтобы избежать возможных колебаний в кинетике стационарной активации и инактивации все протоколы записывались как минимум 5-10 мин после перехода в конфигурацию whole-cell.

2.11 Анализ данных

Для получения вольт-амперных характеристик натриевого тока (I/V) был использован следующий протокол: импульсы деполяризации клетки от поддерживаемого потенциала -100 мВ до напряжения между -80 и 40 мВ в течение 20 мс с шагом 5 мВ. Плотность тока (пА/пФ) получена путем нормирования амплитуды INa на емкость клетки. Потенциал реверсии рассчитывался путем линейной экстраполяции пиковых токов при потенциалах деполяризации от 10 до 40 мВ. Зависимость активации от напряжения представляет собой зависимость нормированной проводимости (доли активированных каналов) от мембранного потенциала и рассчитывается из I/V протокола. Стационарная активация оценивается с помощью функции Больцманна $G/G_{max} = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$, где G_{max} – максимальная проводимость для натрия, $V_{1/2}$ – потенциал, при котором активировано 50% каналов и k – константа наклона.

Также применялся ряд дополнительных протоколов для выявления таких характеристик мутантных каналов, как стационарная инактивация, стационарная быстрая инактивация и

стационарная медленная инактивация. Стационарная инактивация была получена с помощью следующего протокола: поддерживающий потенциал на мембране – -100мВ, преимпульс 500мс, варьирующий по напряжению от -120 до 0 мВ с шагом 5 мВ с последующей деполяризацией -20 мВ (тестирующий импульс). Стационарная быстрая инактивация измерялась при помощи следующего протокола. Клетки находились при потенциале -100 мВ, а затем были гипер- и деполяризованы в течение 20 мс до напряжений между -120 и 0 мВ с шагом 5 мВ, а затем деполяризованы в течение 20 мс при напряжении, вызывающем максимальный ответ в I/V-протоколе. Параметры кривых стационарной инактивации и стационарной быстрой инактивации определялись из уравнения Больцманна $I/I_{max} = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$, где I_{max} – максимальный натриевый ток, $V_{1/2}$ – потенциал, при котором инактивировано 50% каналов и k – константа наклона.

Стационарная медленная инактивация измерялась с использованием 10 с преимпульса при напряжении в диапазоне от -120 до 0 мВ с шагом 5 мВ с последующей гиперполяризацией до -120 мВ в течение 100 мс, чтобы удалить быструю инактивацию и 20 мс тестовым импульсом, который вызывает максимальный ответ в I/V протоколе.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В нашем исследовании мы использовали спектр тканеспецифических точечных мутаций в гене *LMNA*, связанных с определенным фенотипом заболевания. Таким образом, на основе введения мутантного гена ламина А/С в клетки на лентивирусном носителе мы моделировали фенотип заболевания на различных клеточных моделях.

3.1 Исследование влияния тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на мышечную дифференцировку

В качестве клеточных моделей мышечной дифференцировки были выбраны мышечные миобласты линии C2C12 и сателлитные клетки мыши. Данный выбор основывался на том, что перечисленные клеточные модели, как было показано, экспрессируют основные маркеры мышечной дифференцировки и способны сливаться с образованием миотрубок.

3.1.1 Влияние G232E и R571S мутаций в гене *LMNA* на процесс формирования миотрубок

Для модификации генома клетки линии C2C12 и первичные сателлитные клетки мыши трансдуцировали концентратом лентивирусных частиц (5 MOI), несущих разные формы человеческого ламина: ламины дикого типа (*LMNA* WT) и мутантные формы (*LMNA* G232E и *LMNA* R571S).

Был произведен сравнительный анализ эффективности заражения клеток разными формами ламина. Для этого проводили иммуноцитохимическую окраску миотрубок с помощью антител, распознающих ламина А/С человека (зеленый цвет на Рисунке 10, А). Для визуализации миотрубок клетки красили с помощью антител, распознающих тяжелые цепи миозина мыши (красный цвет на Рисунке 10, А). Анализ эффективности трансдукции клеток эндогенными формами *LMNA* не показал значимых различий при использовании разных форм *LMNA* (*LMNA* WT/*LMNA* G232E/*LMNA* R571S). Процентное соотношение ядер, визуализируемых после иммуноцитохимической окраски на ламина А/С человека, для разных форм ламина было следующим: для *LMNA* WT – 30,57% (n анализируемых миотрубок=105), в случае *LMNA* G232E – 29,93% (n=99), и в случае *LMNA* R571S – 46,93 % (n=100) (Рисунок. 10, А). Кроме того, не было обнаружено каких-либо видимых нарушений в морфологии ядер.

С целью оценки влияния мутантных форм ламина на процесс мышечной дифференцировки (формирование мотрубок), использовали сателлитные клетки мыши, которые трансдуцировали лентивирусом, несущим *LMNA* G232E или *LMNA* R571S. В качестве контроля выступали сателлитные клетки, трансдуцированные лентивирусом, несущим *LMNA* WT. Трансдуцированные

клетки дифференцировали в течение 7 дней в среде с низким содержанием сыворотки. Морфологию миотрубок, экспрессирующих экзогенные формы ламина, оценивали с помощью иммуноцитохимической окраски на десмин и тяжелые цепи миозина (Рисунок. 10, Б). Контролем выступали миотрубки, полученные на основе сателлитных клеток, несущих *LMNA* WT, а также миотрубки, образованные на основе нетрансдуцированных сателлитных клеток. Было установлено, что мутантные миотрубки характеризуются меньшей длиной по сравнению с контролем. Также было показано, что мутации приводят к образованию миотрубок с нарушенным процессом расхождения ядер.

Для количественной характеристики результатов, полученных после иммуноцитохимической окраски мутантных и контрольных миотрубок, были посчитаны длины миотрубок (количество ядер, инкорпорированных в миотрубку) (Рисунок. 10, В). Длины контрольных миотрубок (несущих *LMNA* WT/нетрансдуцированные) в 65-70% случаев содержали более 15 ядер. Однако миотрубки, несущие *LMNA* R571S, в 60% случаев содержали 5-10 ядер; а миотрубки с *LMNA* G232E – всего лишь 1-2 ядра.

Существует два механизма, объясняющих почему клетки, несущие мутацию, образуют миотрубки с нарушенным процессом мышечной дифференцировки: 1) нарушение деления в клетках вследствие мутаций; 2) нарушение процесса слияния. С целью оценки процесса слияния клеток был посчитан индекс слияния (индекс слияния = (N ядер, инкорпорированных в миотрубки/N всех ядер) × 100%) (Рисунок 10, Г). Индексы слияния у контрольных миотрубок составляли $47,99 \pm 0,45\%$ (для *LMNA* WT) и $46,97 \pm 1,49\%$ (для нетрансдуцированных клеток). В то же время, индексы слияния у мутантных миотрубок были ниже – $17,98 \pm 1,83\%$ (для *LMNA* R571S) и $12,42 \pm 4,24\%$ (для *LMNA* G232E). Данные по длинам миотрубок и индексам слияния дополняли друг друга, клетки с наименьшим индексом слияния, имели наименьшую длину. И наоборот, клетки с повышенным индексом слияния были способны образовывать длинные трубки.

Кроме того, при анализе морфологии миотрубок, несущих разные формы гена ламина, были обнаружены «анормальные» миотрубки, клетки, в которых был нарушен процесс расхождения ядер к полюсам (Рисунок. 10, Д). Было посчитано количество таких анормальных миотрубок для всех форм ламина: для *LMNA* G232E – $61,65 \pm 6,23\%$ от общего числа миотрубок, в случае *LMNA* R571S – $64,68 \pm 4,62\%$, в случае эндогенной формы ламина и *LMNA* WT – $6,94 \pm 2,16\%$ (Рисунок. 10, Е). Таким образом, наши данные указывают на то, что мутации в гене *LMNA* связаны с нарушением процесса расхождения ядер к полюсам при формировании миотрубок (Перепелина и др., 2017).

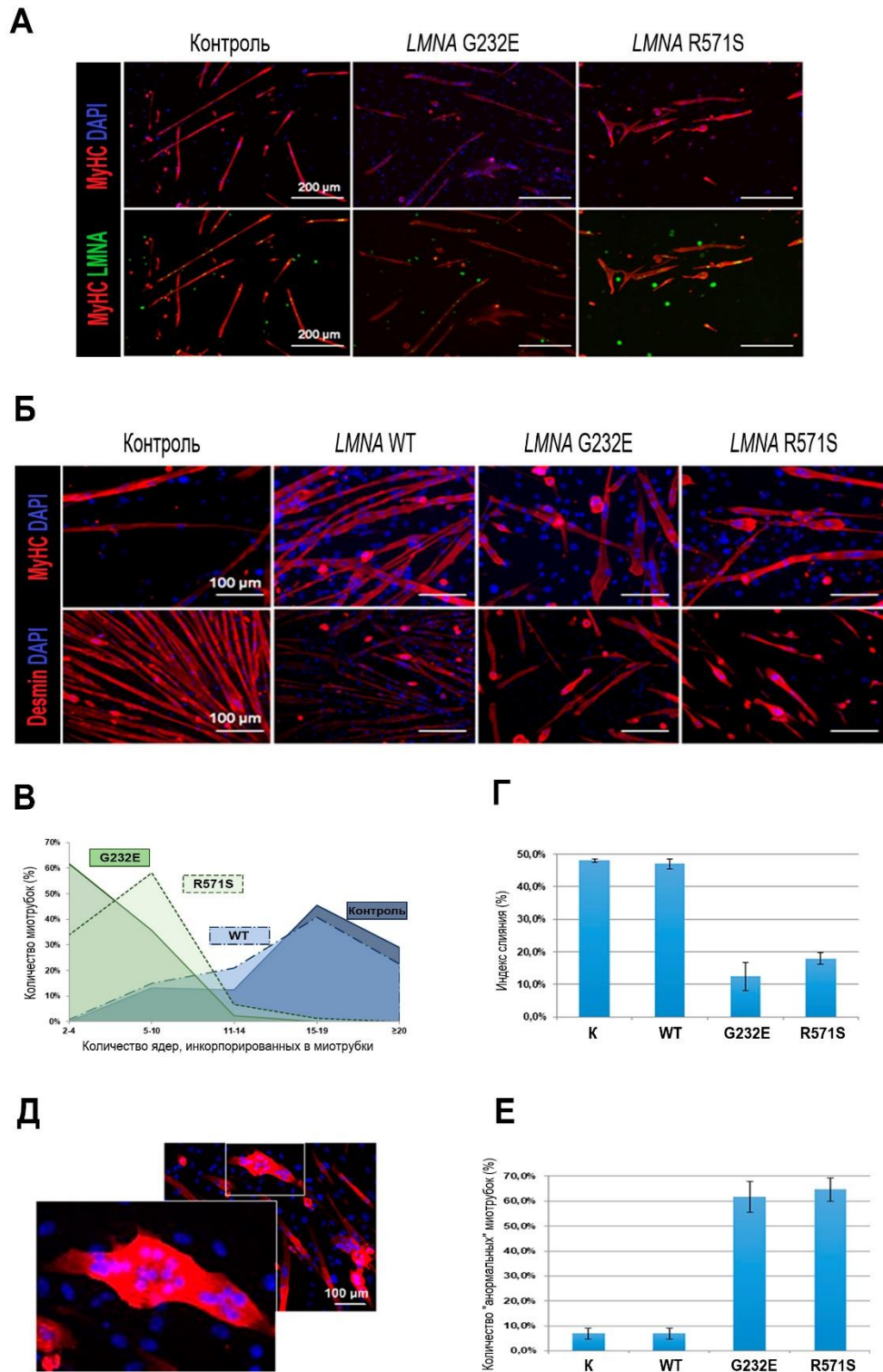


Рисунок 10. Морфологическая характеристика миотрубок, несущих трансгенные формы ламина А/С (*LMNA*).

(А) Иммуноцитохимическая окраска миотрубок, образованных сателлитными клетками мышцы, несущих разные формы ламина. Тяжелые цепи миозина (MyHC, красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет) и антителами к человеческому ламину (зеленый цвет).

(Б) Иммуноцитохимическая окраска миотрубок, образованных сателлитными клетками мышцы, несущих разные формы ламина. Окраска на десмин (Desmin) и тяжелые цепи миозина (MyHC) (красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет).

(В) Процентное соотношение длин миотрубок, экспрессирующих разные формы ламина.

Миотрубки, экспрессирующие эндогенный ламин (n=120 миотрубок) и *LMNA* WT (n=120 миотрубок), содержат 15-19 ядер. Миотрубки с *LMNA* R571S (n=74 миотрубки) содержат 5-10 ядер, а миотрубки с *LMNA* G232E (n=62 миотрубки) – 2-4 ядра.

(Г) Индекс слияния миотрубок, несущих разные формы ламина. Данные представлены в виде средних значений \pm SD (n проанализированных миотрубок: К (контроль)=120, *LMNA* WT=120, *LMNA* G232E=62, *LMNA* R571S=74).

(Д) Пример «анормальной» миотрубки. Окраска на десмин (красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет).

(Е) Количество «анормальных» миотрубок, несущих разные формы ламина. Данные представлены в виде средних значений \pm SD (n проанализированных миотрубок: К (контроль)=120, *LMNA* WT=120, *LMNA* G232E=62, *LMNA* R571S=74) (Перепелина и др., 2017).

3.1.2 Влияние G232E и R571L мутаций в гене *LMNA* на экспрессию основных генов мышечной дифференцировки

Далее мы проанализировали изменение экспрессии миогенных маркеров в клетках линии C2C12 вследствие мутаций *LMNA* G232E и *LMNA* R571S при мышечной дифференцировке. Для этого мы использовали метод ПЦР в режиме реального времени, оценивая экспрессию следующих генов: *Pax3*, *Myf5*, *Myomaker*, *MyoD*, *MyoG*, *Myh4*, *Mrf4* (Рисунок 11). Клетки линии C2C12, трансдуцированные лентивирусом, несущим *LMNA* WT/*LMNA* G232E/*LMNA* R571S, дифференцировали в течение 24 часов, 72 часов и 7 дней.

Результат по экспрессии генов показал изменения в уровнях экспрессии некоторых генов, вызванные действием мутаций. Мутация *LMNA* G232E приводила к статистически значимому снижению экспрессии гена *Myomaker* через 24 часа и 7 дней после индукции дифференцировки по сравнению с клетками, трансдуцированными *LMNA* WT. При *LMNA* R571S также наблюдалось снижение экспрессии *Myomaker* на 7 день дифференцировки.

Также было показано, что мутации вызывают повышение экспрессии *Myf5* и *MyoD* в клетках на ранней стадии дифференцировки (24 часа). На более поздней стадии мышечной дифференцировки (7 дней) было отмечено снижение уровня экспрессии *MyoG* и *Mrf4* под действием *LMNA* G232E мутации по сравнению с *LMNA* WT (Перепелина и др., 2017).

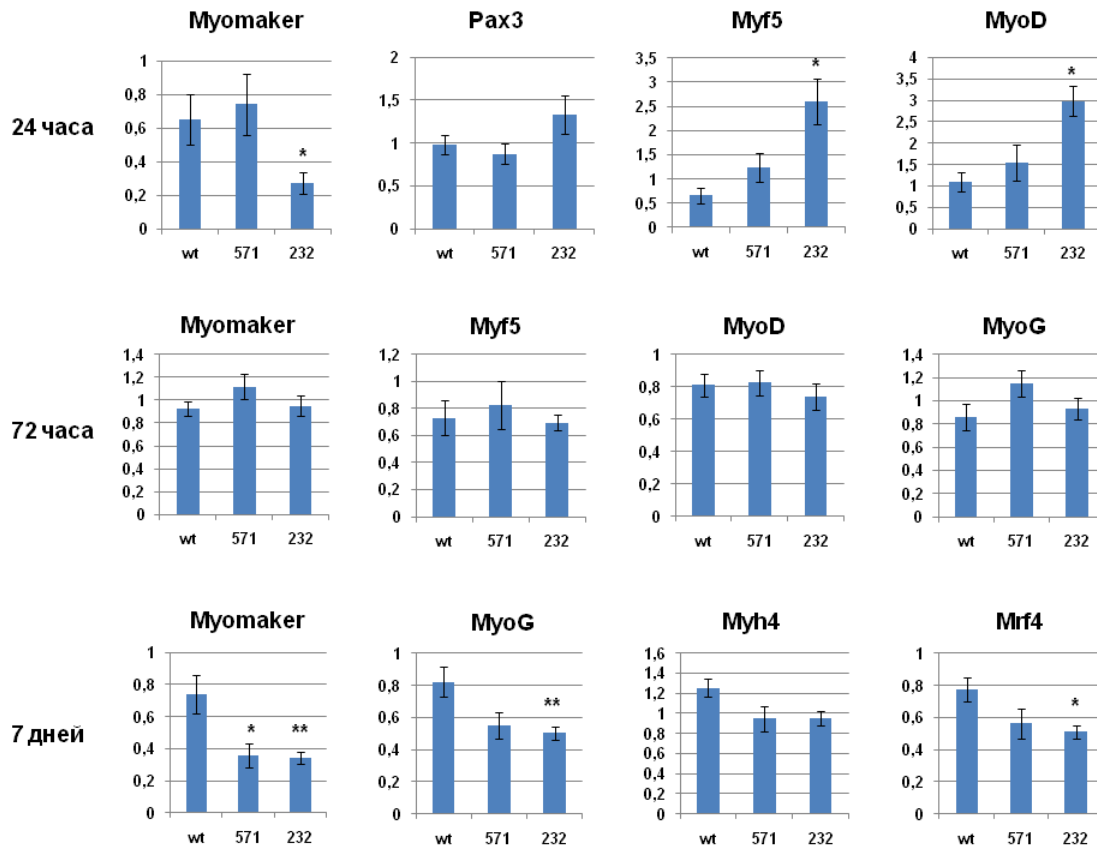


Рисунок 11. Оценка влияния *LMNA* R571S и *LMNA* G232E на экспрессию миогенных маркеров при мышечной дифференцировке клеток линии C2C12. По оси OY указано относительное количество мРНК для каждого гена, измеренное по методу $2^{-\Delta\Delta C_T}$, и нормированное на образец *LMNA* WT. Данные представлены в виде средних значений по 4-6 биологическим повторам \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; wt – *LMNA* WT; 571 – *LMNA* R571S; 232 – *LMNA* G232E (Перепелина и др., 2017).

3.1.3 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния мутаций в гене *LMNA* (G232E и R571S) на процесс мышечной дифференцировки миобластов мышцы линии C2C12 и первичных сателлитных клеток мышцы

Мы провели оценку влияния *LMNA* мутаций, ассоциированных с развитием мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса (*LMNA* G232E) и дилатационной кардиомиопатии (*LMNA* R571S), то есть затрагивающих скелетную мускулатуру и сердечную мускулатуру соответственно, на процесс мышечной дифференцировки. Мы показали, что анализируемые мутации приводят к нарушению процесса мышечной дифференцировки – нарушению слияния клеток и формированию миотрубок. Миотрубки, экспрессирующие мутантные формы ламина, характеризовались меньшим числом ядер по сравнению с миотрубками, экспрессирующими экзогенный ламин дикого типа и эндогенную форму ламина. Мы установили, что образование коротких миотрубок было ассоциировано со снижением индекса слияния клеток. Кроме того, мутантные клетки часто образовывали «анормальную» миотрубки (ядра концентрировались в середине миотрубок) (Cadot et al., 2012; Yin et al., 2013). Таким образом, процесс дифференцировки был нарушен не только на ранних этапах слияния миобластов, но и на более поздних, когда миотрубка уже сформирована.

Полученные нами результаты по оценке влияния мутаций гена ламина на морфологию миотрубок подтверждают и дополняют имеющиеся литературные данные. Одна из ранних работ была выполнена на культуре клеток C2C12, которые экспрессировали *LMNA* R453W, первую описанную мутацию ламина у больного МДЭД. Клетки, содержащие данную мутацию, имели сниженную способность к процессу дифференцировки. Анализ экспрессии миогенных маркеров выявил сниженный уровень *MyoG*, при этом экспрессия более раннего маркера *MyoD* оставалась неизменной (Favreau et al., 2004a). В еще одной работе, в которой использовали ту же клеточную линию (C2C12), и анализировали ту же мутацию (R453W), также выявили снижение экспрессии *MyoG* (Håkelién et al., 2008). Было показано, что влияние мутаций гена ламина на экспрессию *MyoD* и *MyoG* связано с участием ламина А в регуляции сигнальных путей Rb/E2F и Rb/MyoD (Pekovic et al., 2007).

В экспериментах на первичных сателлитных клетках, полученных от мышей-нокаутов по гену *Lmna*, было показано, что миобласты демонстрировали сниженную скорость пролиферации, а не сниженный индекс слияния, как в нашей работе (Cohen et al., 2013). Это несоответствие с нашими результатами может быть объяснено разными клеточными моделями, используемыми в работах. Возможно, в клетках, полностью лишенных ламина, активируются компенсаторные механизмы, которых нет при экспрессии мутантной формы.

Наши данные по экспрессии гена *Myf5* (повышенный уровень экспрессии через 24 часа после индукции дифференцировки – при действии *LMNA* G232E) согласовываются с результатами экспериментов, проводимых на первичных миоблестах мышей-нокаутов по гену *Lmna*. При отсутствии ламина в клетках экспрессия транскрипционного фактора *Myf5* была повышена, а маркеры сателлитных клеток *Pax3/Pax7* свой уровень экспрессии не меняли (Frock et al., 2006). Кроме того, существуют работы, в которых авторы анализировали биопсийный материал, полученный от больных с мутацией гена *LMNA*. Сателлитные клетки этих пациентов также имели сниженный уровень экспрессии *MyoD*, но при этом количество клеток, экспрессирующих *Pax7* было увеличено (Park et al., 2009). Что соответствует нашим результатам по экспрессии гена *Pax3*.

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

Также в нашей работе было выявлено снижение экспрессии гена *Myomaker* через 24 часа после начала дифференцировки для *LMNA* G232E и спустя семь дней после начала дифференцировки для обеих мутаций. Сниженный уровень экспрессии *Myomaker* может быть следствием сниженного уровня экспрессии *MyoG*. К настоящему моменту до конца не ясно, под контролем каких

транскрипционных факторов находится *Myomaker*, предположительно это факторы MyoD и MyoG, так как ген *Myomaker* имеет в своем промоторе последовательность для связывания с транскрипционными факторами типа «спираль-петля-спираль», какими и являются MyoD и MyoG (Millay et al., 2014). Таким образом, сниженная экспрессия *MyoG* может приводить к сниженной экспрессии *Myomaker*.

Тот факт, что при действии мутации, затрагивающей мышечную мускулатуру, *LMNA* G232E, происходит снижение экспрессии *Myomaker* уже через 24 часа после индукции дифференцировки, соответствует данным о меньшей длине образуемых при этой мутации миотрубок и самым низким индексом слияния клеток.

Таким образом, мутация, ведущая к развитию скелетно-мышечного фенотипа, оказывает наибольший негативный эффект на способность миобластов к слиянию и экспрессию основных маркеров мышечной дифференцировки. Эти данные подтверждают тканеспецифичный характер развития заболевания (Перепелина и др., 2017).

3.2 Исследование влияние мутаций в гене *LMNA* на процесс адипогенной дифференцировки

Для исследования эффекта тканеспецифичной мутации в гене *LMNA* (R482L) на адипогенную дифференцировку, в качестве клеточной модели мы использовали мезенхимные клетки сердца (МКС) человека. Было показано, что МКС способны дифференцироваться в адипогенном направлении (Малашичева и др. 2015), что подтверждает обоснованность использования данных клеток в качестве модели для исследования механизмов развития заболеваний, при которых происходит нарушение адипогенеза.

3.2.1 Оценка морфологии ядер

На первом этапе работы осуществляли модификацию клеточного генома с помощью трансдукции лентивирусными конструкциями, несущими ген человеческого ламина дикого типа (*LMNA* WT) или мутантные формы (*LMNA* R482L или *LMNA* R527C). Для оценки эффективности клеточной трансдукции использовали МКС крысы с целью визуализации в них экспрессии человеческого ламина A/C. Экспрессию экзогенных форм ламина подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием с помощью антител, специфически распознающих ламин A/C человека. В качестве положительного контроля использовали нетрансдуцированные МКС человека (Рисунок 12).

Результаты окраски демонстрируют изменения морфологии ядер («пузырение» ядерной мембраны) в клетках, трансдуцированных лентивирусом, несущим *LMNA* R482L. В ядрах

контрольных (нетрансдуцированных) клеток и клеток, экспрессирующих *LMNA* WT, не было зафиксировано каких-либо изменений в ядерной морфологии (Perrepelina et al., 2018).

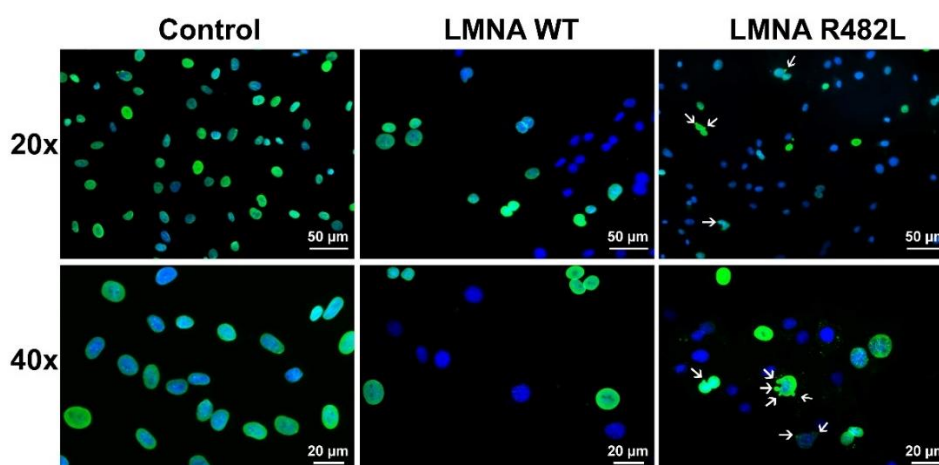


Рисунок 12. Анализ экспрессии трансгенных форм ламина А/С в МКС крысы. Иммуноцитохимическая окраска стволовых клеток сердца крысы на ламин А/С человека (зеленый цвет), ядра дополнительно окрашены DAPI (синий цвет). В качестве контроля (Control) – нетрансдуцированные стволовые клетки сердца человека (Perrepelina et al., 2018).

3.2.2 Оценка влияния *LMNA* R482L на активность сигнального пути Notch в недифференцированных клетках

Все дальнейшие эксперименты проводили с использованием МКС человека. Чтобы изучить влияние мутации *LMNA* на активность сигнального пути Notch, мы измерили уровень экспрессии генов-мишеней Notch в МКС человека. В клетках, трансдуцированных лентивирусом с *LMNA* WT или *LMNA* R482L, был активирован сигнальный путь Notch с помощью введения внутриклеточного домена Notch (NICD) на лентивирусном носителе для дальнейшего анализа экспрессии Notch-зависимых генов: *HEY1*, *SLUG*, *CMYC* (с-Мус) и *CCND3* (циклин D3). Введение NICD приводило к существенному повышению экспрессии *HEY1*, что является следствием активации сигнального пути Notch. *LMNA* R482L вызывал статистически значимое снижение экспрессии *HEY1*, *SLUG*, *CMYC* (с-Мус) и *CCND3* по сравнению с *LMNA* WT (Рисунок 13). Эти данные указывают на то, что мутантный ламин А/С оказывает ингибирующее действие на активность Notch (Perrepelina et al., 2018).

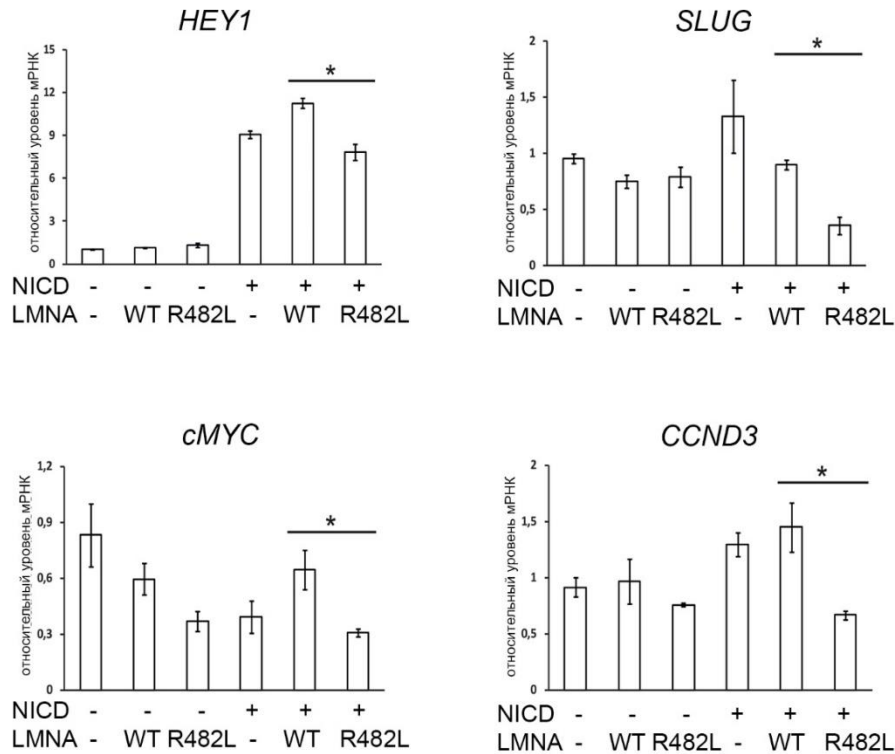


Рисунок 13. Мутация *LMNA* R482L приводит к изменению экспрессии генов-мишеней Notch в МКС человека в условиях активации Notch. Относительную экспрессию генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Значения представлены в виде среднего значения \pm SD, (n = 3); *, p < 0,05, (n=3) (Perpelina et al., 2018).

3.2.3 Оценка влияния *LMNA* R482L на адипогенную дифференцировку в условиях активации Notch

Мы продемонстрировали, что МКС человека обладают способностью дифференцироваться в адипогенном направлении. Была проведена окраска дифференцированных МКС с использованием специфического красителя Oil Red (на 14 день), а также ПЦР в режиме реального времени (на 3 день) на адипогенные маркеры (*AP2* и *PPARG*) (Рисунок 14).

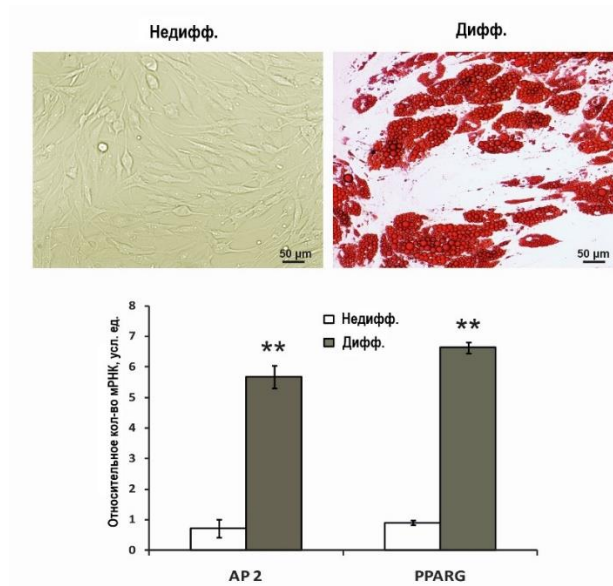


Рисунок 14. Проверка адипогенного потенциала МКС человека. На верхней панели показаны изображения недифференцированных (Недифф.) и дифференцированных (Дифф.) клеток, окрашенных красителем Oil Red. На нижней панели продемонстрированы результаты анализа экспрессии адипогенных маркеров *AP2* и *PPARG* с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены в виде средних значений \pm SD, (n = 3); **, p < 0,01 (Perepelina et al., 2018a).

Для оценки эффекта мутантного *LMNA* на экспрессию генов-мишеней Notch во время адипогенной дифференцировки МКС мы трансдуцировали клетки лентивирусами, несущими *LMNA* WT или *LMNA* R482L, и активировали Notch с помощью NICD как было описано ранее. Далее контрольные (нетрансдуцированные) и трансдуцированные МКС были индуцированы к адипогенной дифференцировке. На рисунке 15 показано, что активация Notch ингибирует адипогенную дифференцировку, что было определено путем подсчета площади дифференцированных клеток и анализа экспрессии *AP2* и *PPARG* (Рисунок 15, А, Б). В отсутствие активации Notch *LMNA* R482L не оказывала заметного влияния на адипогенную дифференцировку МКС по сравнению с *LMNA* WT. В то же время, при активации Notch *LMNA* R482L вызывала статистически значимое снижение количества дифференцированных клеток, а также снижение экспрессии адипогенных маркеров *AP2* и *PPARG*. Таким образом, *LMNA* R482L ингибирует адипогенную дифференцировку МКС только в условиях активации сигнального пути Notch (Perepelina et al., 2018).

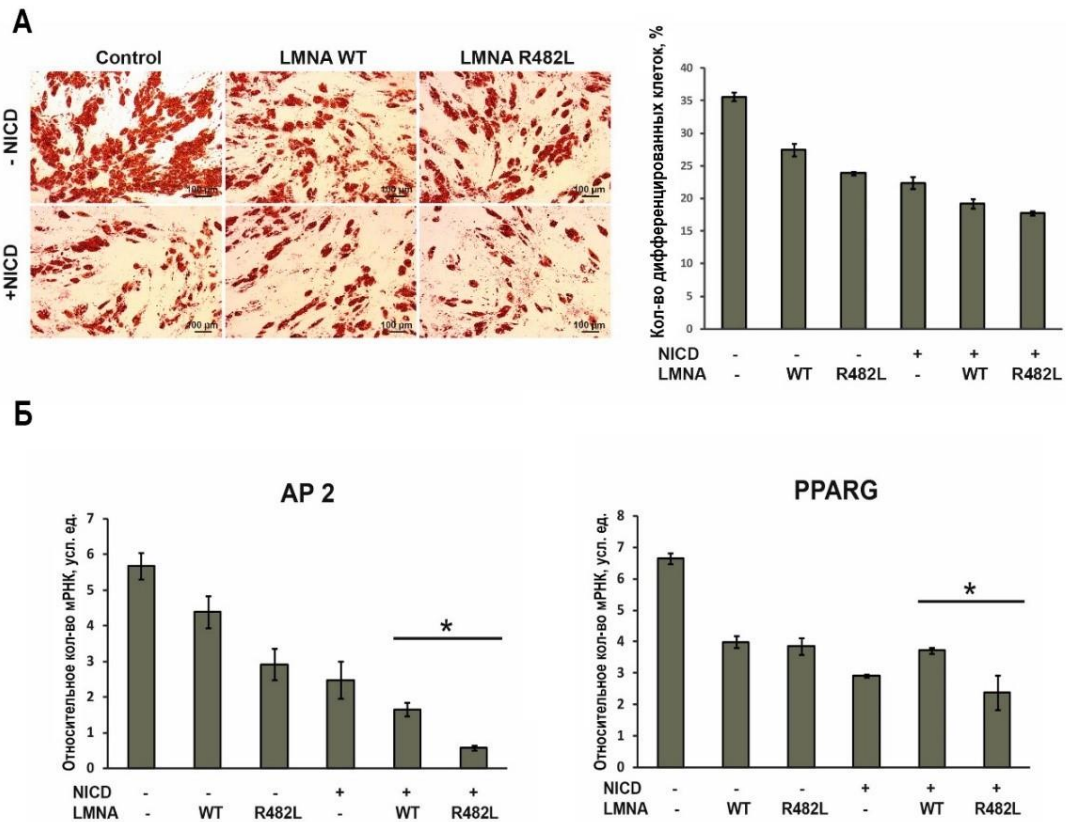


Рисунок 15. Мутация *LMNA* R482L приводит к подавлению адипогенной дифференцировки МКС человека в условиях активации Notch. (А) Левый рисунок – дифференцированные клетки после окрашивания красителем Oil Red. Правый рисунок – результаты подсчета площади дифференцированных клеток. (Б) Результаты анализа экспрессии адипогенных маркеров *AP2* и *PPRG* методом ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены в виде средних значений \pm SD, (n = 3); *, p < 0,05 (Perrepelina et al., 2018).

3.2.4 Оценка влияния *LMNA* R482L на активность сигнального пути Notch в дифференцированных МКС

Целью данного этапа работы было исследование влияния мутантной формы ламина (*LMNA* R482L) на активность сигнального пути Notch при индукции адипогенной дифференцировки. Модификацию генома МКС производили при помощи введения *LMNA* WT или *LMNA* R482L на лентивирусном носителе. Notch активировали с помощью трансдукции лентивирусом, несущим NICD. Активность сигнального пути Notch оценивали по уровню экспрессии генов-мишеней Notch (*HEY1* и *NOTCH1*) методом ПЦР в режиме реального времени на 3 день дифференцировки. Мы обнаружили ингибирование Notch в клетках, экспрессирующих мутантный ламин A/C, в условиях активации Notch по сравнению с клетками дикого типа. Также, в качестве дополнительной оценки активности Notch, мы использовали репортерную люциферазную конструкцию CSL-luc, уровень активности которой отражает активность CSL-зависимой транскрипции. Люциферазная активность CSL-luc подтвердила результаты ПЦР в режиме реального времени (Рисунок 16) (Perrepelina et al., 2018).

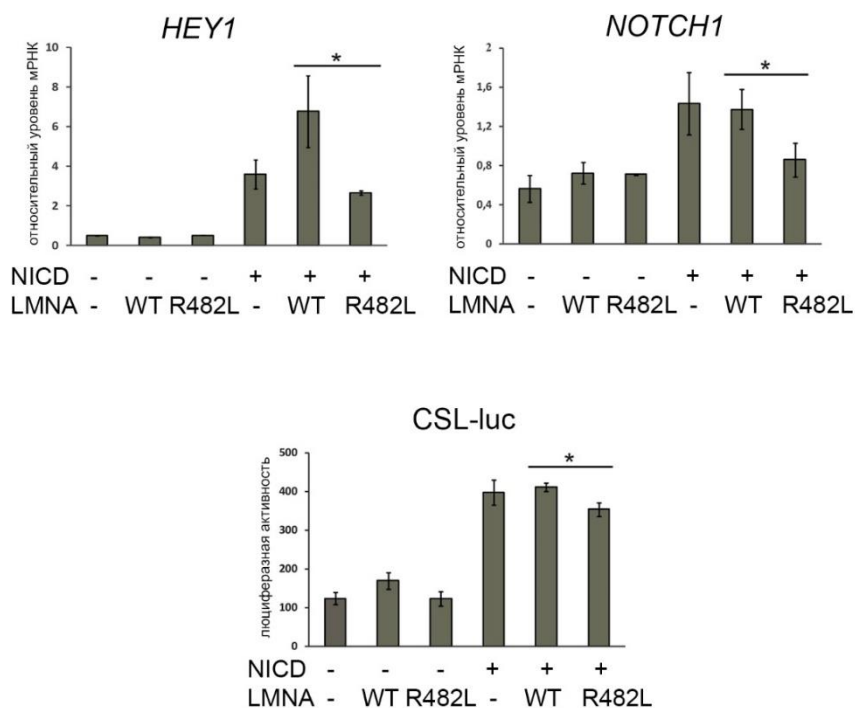


Рисунок 16. *LMNA* R482L приводит к подавлению экспрессии генов-мишеней Notch в дифференцированных МКС человека. Относительный уровень мРНК *HEY1* и *NOTCH1* оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Активность сигнального пути Notch дополнительно измеряли с помощью люциферазного репортера CSL-luc. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (n = 3), *, p < 0,05 (Perpelina et al., 2018).

3.2.5 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния мутации в гене *LMNA* (R482L) на адипогенную дифференцировку и функционирование сигнального пути Notch

Мы показали, что *LMNA* R482L вызывала морфологические изменения в структуре ядра, проявляющиеся в виде ядерных пузырей в МКС крысы. Структурные аномалии в ядерной ламине, вызванные мутациями в *LMNA*, могут способствовать нарушенному взаимодействию между ламинами и хроматином. Ранее уже было показано, что *LMNA* R482L приводит к нарушению ядерной ламины в фибробластах, полученных от пациентов с FPLD (Caranni et al., 2003).

На уровне экспрессии генов мы показали, что введение в клетки мутантной формы *LMNA* R482L приводит к снижению экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch: *HEY1*, *SLUG*, *C-MYC*, *CCND3* – по сравнению с *LMNA* WT в недифференцированных клетках. Полученные данные свидетельствуют о том, что мутантные формы ламина оказывают негативное влияние на функционирование сигнального пути Notch.

Также мы показали, что при дополнительной активации Notch, при помощи введения NICD на лентивирусном носителе, *LMNA* R482L оказывает негативное влияние на функционирование сигнального пути Notch по сравнению с ламин дикого типа (*LMNA* WT). Данные результаты были получены с помощью ПЦР в режиме реального времени на ген *HEY1* и подтверждены с помощью

репортерной люциферазной конструкции.

Также было показано, что мутация в гене *LMNA* R482L приводит к снижению дифференцировочного потенциала. Сигнальный путь Notch также оказывал негативное влияние на процесс адипогенной дифференцировки. Результаты ПЦР в реальном времени показали, что одновременное введение NICD и *LMNA* R482L приводит к достоверному снижению уровня экспрессии генов *AP2* и *PPARG* по сравнению с *LMNA* WT. Были опубликованы подобные работы с участием мутантной формы ламина, приводящей к прогерии (Meshorer and Gruenbaum, 2008; Scaffidi and Misteli, 2008). Ранее сообщалось, что избыточная экспрессия ламина A/C подавляет адипогенную дифференцировку (Bermeo et al., 2015; Tilgner et al., 2009; Vadrot et al., 2014). Кроме того, было показано, что мутация *LMNA* R482W влияет на регуляторную активность белка SREBP1, фактора транскрипции, который регулирует сотни генов, участвующих в метаболизме липидов и дифференцировке адипоцитов (Vadrot et al., 2014). Однако в нашей клеточной модели с использованием мезенхимных клеток сердечного происхождения мы наблюдали *LMNA* R482L-опосредованное ингибирование адипогенной дифференцировки только в условиях активации сигнального пути Notch. Уже было показано, что белок эмерин (партнер по связыванию с ламином A/C) непосредственно взаимодействует с внутриклеточным доменом Notch, тем самым подавляя активность Notch (Lee et al., 2017). В другом исследовании было продемонстрировано, что взаимодействие эмерина с ламином A нарушается в результате *LMNA* R482L в клетках пациентов с FLPD (Caranni et al., 2003). Наши данные о подавлении Notch с помощью *LMNA* R482L в недифференцированных и дифференцированных клетках согласуются с этими данными.

Таким образом, результаты, полученные на данном этапе, позволили высказать предположение о возможности взаимодействия ламинов A-типа с компонентами сигнального пути Notch, а также о том, что изменение дифференцировочного потенциала клеток, экспрессирующих мутантные формы ламина, может происходить при участии Notch (Perepelina et al., 2018).

3.3 Исследование влияния тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на процесс остеогенной дифференцировки мезенхимных клеток человека

Задачей данного этапа исследования было изучить влияние *LMNA* мутаций на остеогенную дифференцировку и активность сигнального пути Notch в нескольких типах клеток мезенхимного происхождения. Для достижения этой цели мы выбрали две мутации в гене *LMNA* (R527C и R471C), ассоциированных с мандибулоакральной дисплазией (MAD), характеризующейся серьезным нарушением процесса остеогенной дифференцировки, и сравнили действие данных мутаций на остеогенную дифференцировку и активность Notch в четырех типах клеток человека мезенхимального происхождения – эндотелиальных клеток пупочной вены (ЭК), мезенхимных клетках сердца (МКС), гладкомышечных клетках аорты (ГМК) и интерстициальных клетках

аортального клапана (ИК).

3.3.1 Оценка морфологии ядер МКС крысы, экспрессирующих трансгенные формы ламина А/С

Мы проанализировали морфологию ядер в МКС крысы, трансдуцированных лентивирусами, содержащими ген человеческого ламина дикого типа (*LMNA* WT), или ген ламина с мутацией (*LMNA* R527C и *LMNA* R471C). Трансдуцированные и контрольные (нетрансдуцированные МКС человека) клетки были окрашены антителами, специфически распознающим ламин А/С человека. В контрольных (нетрансдуцированных) клетках и в клетках, трансдуцированных *LMNA* WT, ядра отмечались без изменений в ядерной морфологии, с нормальным распределением ламина А/С. В клетках, трансдуцированных *LMNA* R527C и R471C, было замечено изменение морфологии части ядер в виде «пузырения» ядерной мембраны (Рисунок 17) (Perepelina et al., 2019).

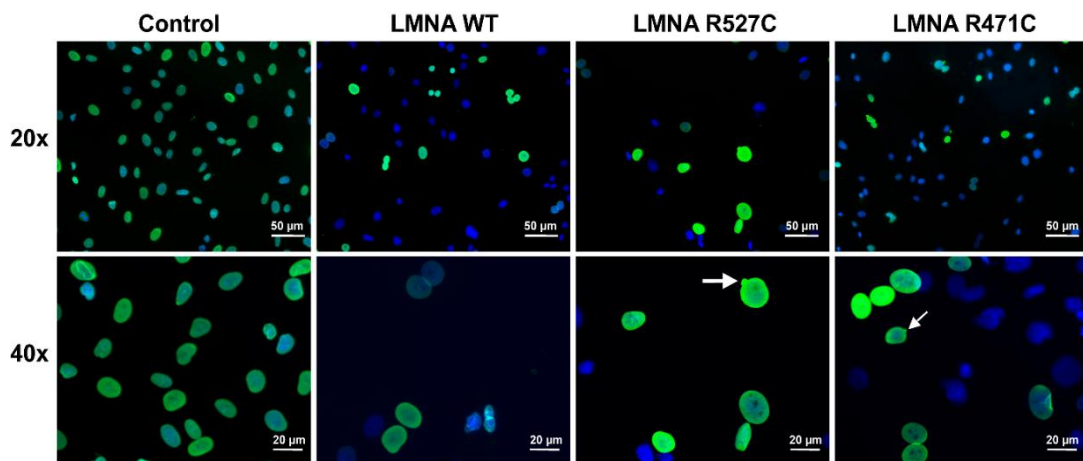


Рисунок 17. Визуализация ламина А/С в МКС крысы, несущих различные формы *LMNA*. Control – нетрансдуцированная МКС человека. Клетки окрашивали антителами против ламина А/С, распознающими человеческий ламин А/С. *LMNA* R527C и *LMNA* R471C приводили к пузырению ядерной мембраны (Perepelina et al., 2019).

3.3.2 Оценка влияния *LMNA* R527C и *LMNA* R471C на экспрессию остеогенных маркеров в мезенхимных клетках человека (ЭК, МКС, ГМК и ИК).

Для того, чтобы оценить способность клеток к остеогенной дифференцировке, мы индуцировали остеогенную дифференцировку в клетках путем добавления специфических факторов в среду культивирования. Сравнение уровней экспрессии остеогенных маркеров (*RUNX2*, *ATF4*, *OPN* и *COL1A1*) в недифференцированных клетках и клетках, дифференцированных в течение 3 дней, оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени (Рисунок 18 – ЭК, 19 – МКС, 20 – ГМК, 21 – ИК, верхний ряд). Мы наблюдали значительное снижение уровня экспрессии гена *RUNX2* в дифференцированных ГМК, а также генов *OPN* и *COL1A1* в дифференцированных ИК по

сравнению с недифференцированными клетками. Однако, мы не наблюдали статистически значимых изменений уровней экспрессии остеогенных маркеров при индукции дифференцировки в МКС и ЭК.

Затем мы проанализировали влияние мутантных форм *LMNA* на экспрессию остеогенных маркеров в дифференцирующихся клетках (Рисунок 18 – ЭК, 19 – МКС, 20 – ГМК, 21 – ИК, нижний ряд). Для этого мы трансдуцировали клетки лентивирусами, несущими *LMNA* WT или мутантную форму *LMNA* (*LMNA* R527C и *LMNA* R471C), и индуцировали остеогенную дифференцировку. Трансдукция *LMNA* R471C приводила к значительному изменению уровня экспрессии остеогенных маркеров: увеличению *RUNX2* и *ATF4* в МКС; увеличению *ATF4* в ГМК; увеличению *RUNX2* и уменьшению *ATF4* и *COL1A1* в ИК. *LMNA* R527C вызывала значительное увеличение уровня экспрессии *RUNX2* в ГМК и ИК, а также снижение уровня экспрессии *COL1A1* в ИК. Кроме того, мы обнаружили очень низкий уровень экспрессии генов *OPN* и *COL1A1* в ЭК, и *OPN* в МКС. В совокупности, эти данные демонстрируют индивидуальный ранний ответ каждого типа клеток на остеогенную индукцию и мутантный *LMNA* (Perpelina et al., 2019).

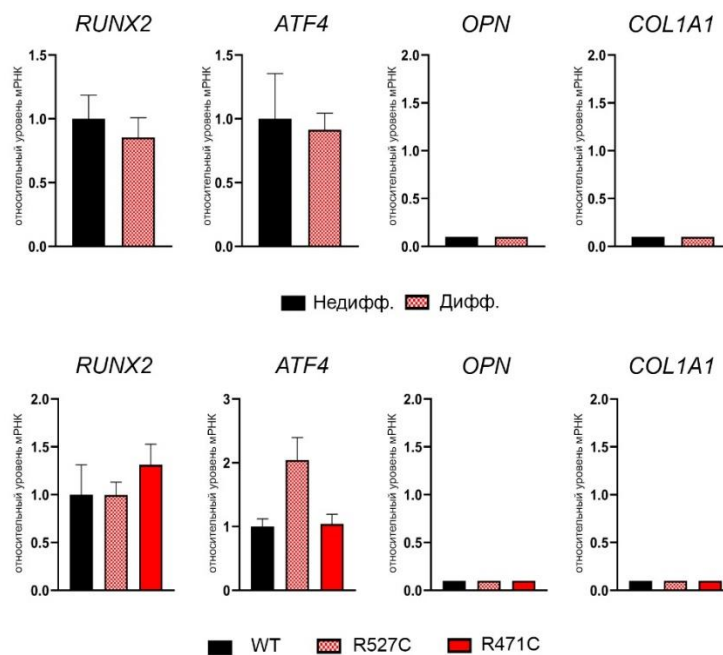


Рисунок 18. Изменение экспрессии остеогенных маркеров в ЭК вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perpelina et al., 2019).

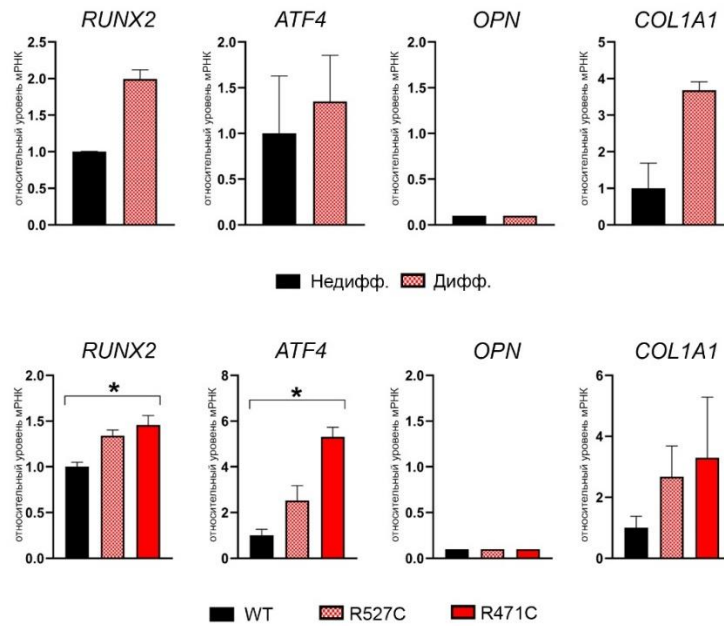


Рисунок 19. Изменение экспрессии остеогенных маркеров в МКС человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

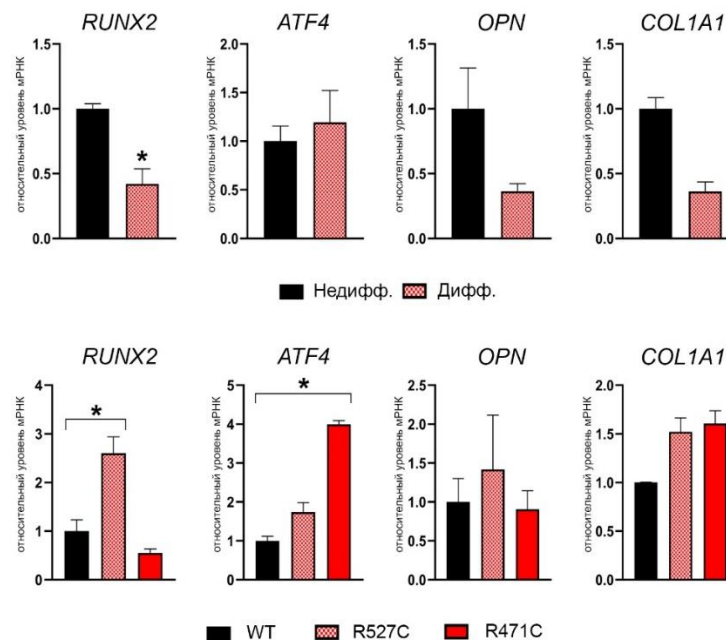


Рисунок 20. Изменение экспрессии остеогенных маркеров в ГМК человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

SD (Perepelina et al., 2019).

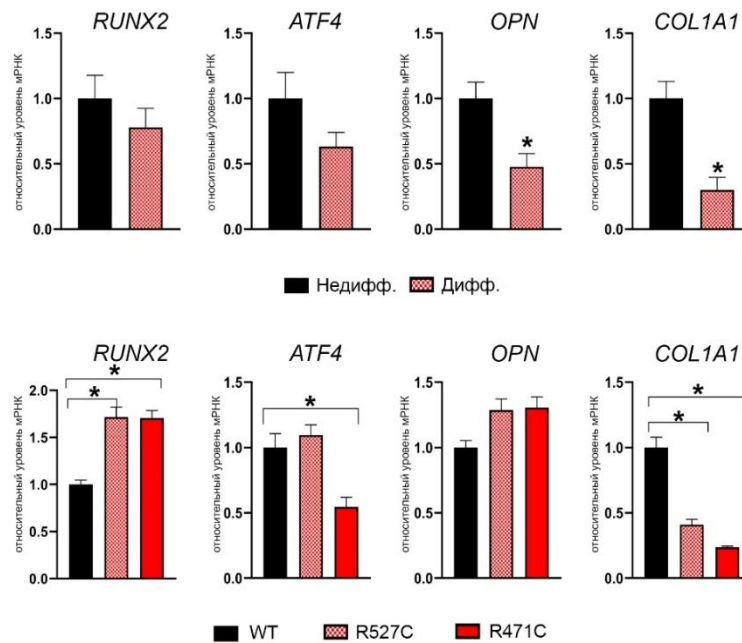


Рисунок 21. Изменение экспрессии остеогенных маркеров в ИК человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

3.3.3 Оценка влияния мутаций *LMNA* R527C/R471C на экспрессию генов-мишеней Notch в мезенхимных клетках человека

С целью изучения возможной кооперации ламинов А-типа с сигнальным путем Notch, мы проанализировали как мутантные формы ламина влияют на экспрессию основных генов-мишеней Notch в четырех типах мезенхимных клеток человека: ЭК, МКС, ГМК и ИК (Рисунок 22, 23, 24, 25 соответственно). Мы трансдуцировали клетки лентивирусами, несущими *LMNA* WT или мутантную форму *LMNA* (*LMNA* R527C/*LMNA* R471C). Индукция остеогенной дифференцировки вызывала статистически значимое увеличение экспрессии *NOTCH1* и *NOTCH3* в МКС по сравнению с недифференцированными клетками (Рис. 23, верхний ряд). Индукция остеогенной дифференцировки в ИК вызывала статистически значимое снижение экспрессии *NOTCH1*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *HEY1*, *HES1* (Рисунок 26, верхний ряд) и снижение только *HES1* для ГМК (Рисунок 24, верхний ряд). В ЭК статистически значимого эффекта не наблюдали (Рисунок 22, верхний ряд).

Затем мы оценили влияние мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C на гены-мишени Notch, по сравнению с *LMNA* WT. Мы обнаружили значительное увеличение уровня экспрессии *NOTCH3* в

МКС, вызванное мутацией *LMNA* R527C, по сравнению с *LMNA* WT (Рисунок 23, нижний ряд). В ГМК, несущих *LMNA* R471C было отмечено значительное снижение уровня экспрессии *NOTCH3* по сравнению с *LMNA* WT (Рисунок 24, нижний ряд). Кроме того, мы продемонстрировали статистически значимые изменения уровней экспрессии генов в ИК: снижение *NOTCH1* и *NOTCH3* и увеличение экспрессии *NOTCH4* в клетках, трансдуцированных *LMNA* R471C; *LMNA* R527C приводила к увеличению экспрессии *HES1* (Рисунок 25, нижний ряд).

Полученные результаты подводят к выводу о том, что мутации в гене *LMNA* подавляют функционирование сигнального пути Notch, и, таким образом, дополняют наши предыдущие предположения о том, что эффект мутаций в *LMNA* может носить клеточно-зависимый характер (Perepelina et al., 2019).

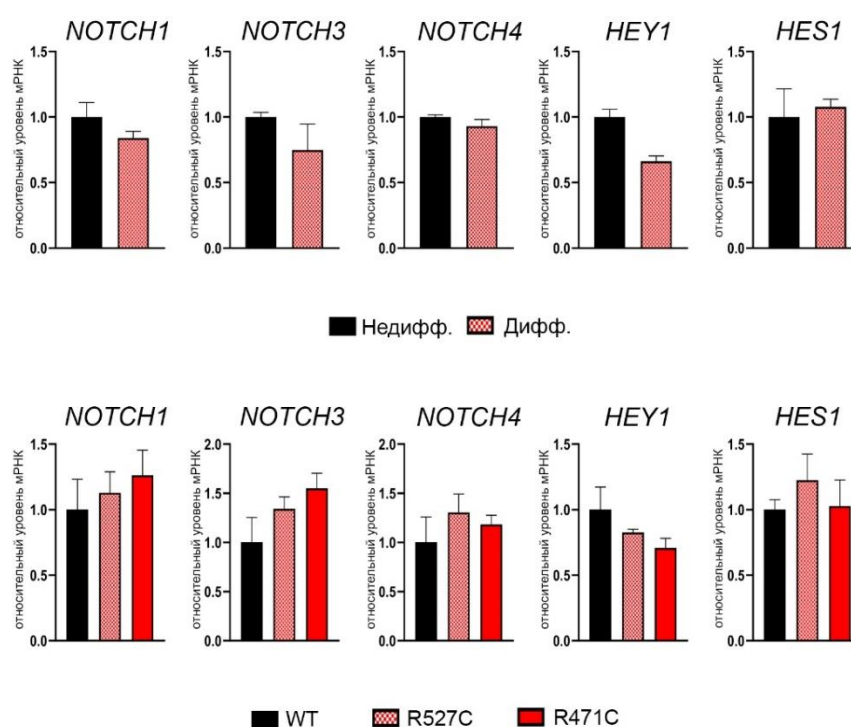


Рисунок 22. Изменение экспрессии Notch-зависимых генов в ЭК человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

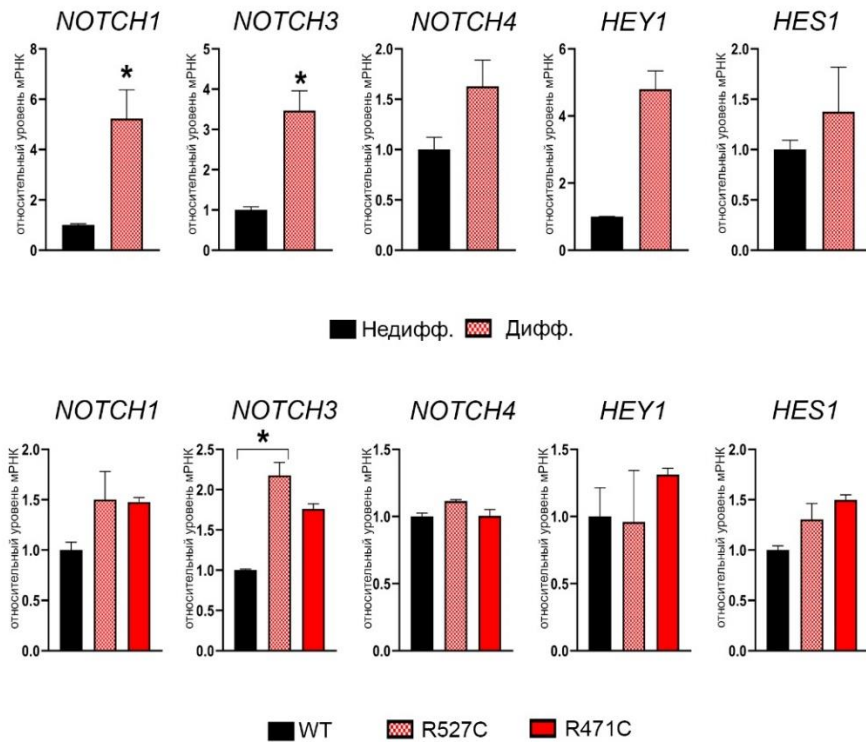


Рисунок 23. Изменение экспрессии Notch-зависимых генов в МКС человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

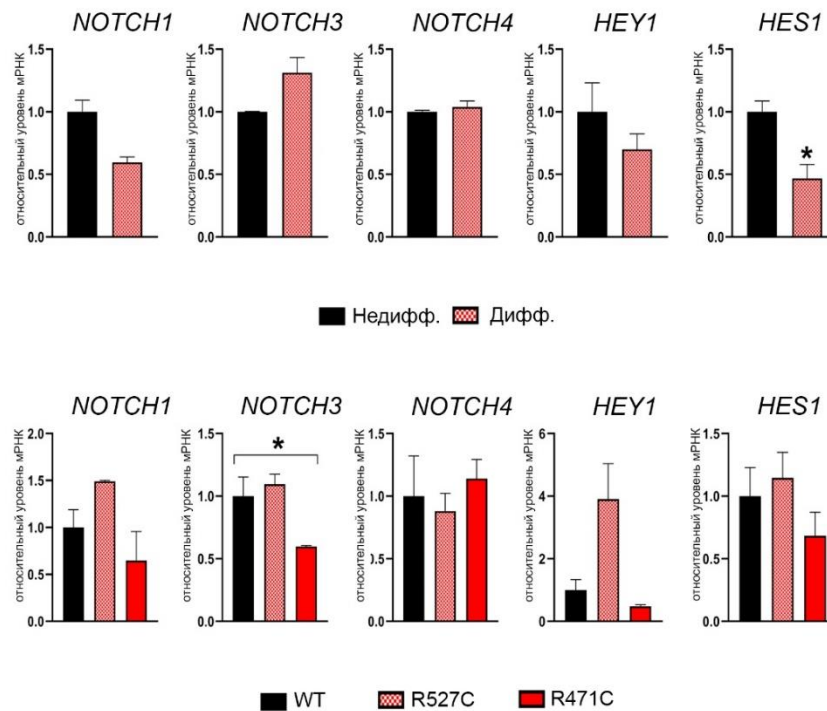


Рисунок 24. Изменение экспрессии Notch-зависимых генов в ГМК человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

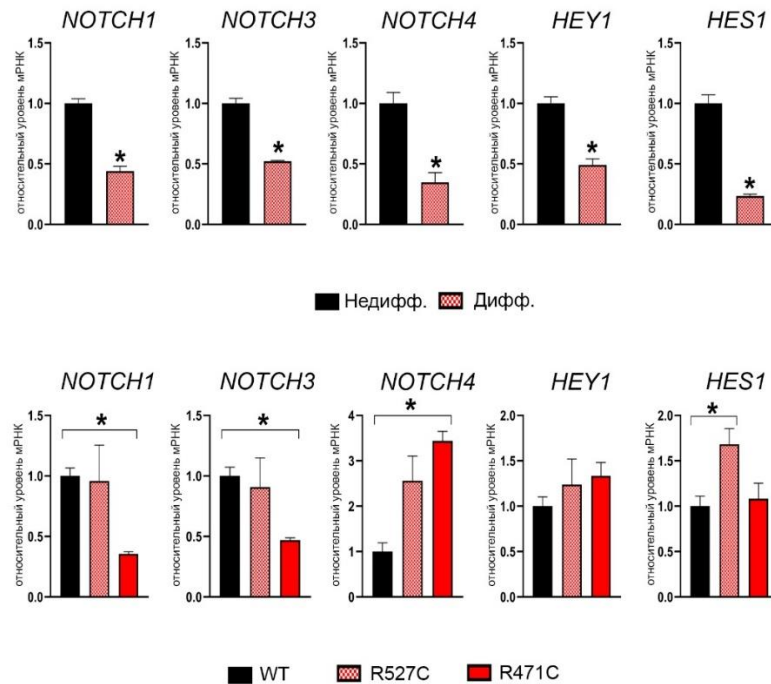


Рисунок 25. Изменение экспрессии Notch-зависимых генов в ИК человека вследствие мутаций *LMNA* R527C и *LMNA* R471C. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Верхний ряд демонстрирует уровень экспрессии в недифференцированных клетках (Недифф) и клетках на 3-й день остеогенной дифференцировки (Дифф). Нижний ряд демонстрирует уровень экспрессии в дифференцированных клетках, несущих либо *LMNA* WT (WT), либо *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perepelina et al., 2019).

3.3.4 Оценка влияния мутации *LMNA* R527C на остеогенную дифференцировку МКС и ИК в условиях активации Notch

Учитывая результаты, полученные на предыдущем этапе работы, мы выбрали две линии мезенхимных клеток (МКС и ИК) для последующих экспериментов, поскольку в них был отмечен более яркий эффект от *LMNA* R527C мутации в условиях активации Notch.

В первую очередь мы исследовали влияние *LMNA* R527C на активность сигнального пути Notch. Введение NICD в МКС и ИК приводило к увеличению экспрессии *HEY1* (Рисунок 26-27, верхняя панель, первый график) на 3 и 12 день дифференцировки, что свидетельствует об активации Notch. Совместное действие *LMNA* R527C мутации и активации Notch приводило к подавлению экспрессии *HEY1* в МКС по сравнению с *LMNA* WT (Рисунок 26, верхняя панель, второй график).

Аналогичным образом, активность люциферазного репортера CSL снижалась в МКС с *LMNA* R527C по сравнению с *LMNA* WT, при активации Notch (Рисунок 26, верхняя панель, третий график). В то же время, ИК с *LMNA* R527C имели повышенный уровень экспрессии *HEY1* по сравнению с *LMNA* WT, в условии активации Notch (Рисунок 27, верхний ряд, второй график).

При исследовании влияния *LMNA* R527C на остеогенную дифференцировку МКС и ИК в условии активации Notch было выявлено подавление остеогенной дифференцировки в МКС, что наблюдалось по уровню экспрессии *RUNX2* (Рисунок 26, нижний ряд, второй график). В то же время, в ИК наблюдалось повышение уровня экспрессии *RUNX2* в тех же условиях (Рисунок 27, нижний ряд, второй график).

Таким образом, мы наблюдали ингибирующее действие *LMNA* R527C на остеогенную дифференцировку в МКС, тогда как *LMNA* R527C вызывала активацию остеогенной дифференцировки в ИК (Perrepelina et al., 2019).

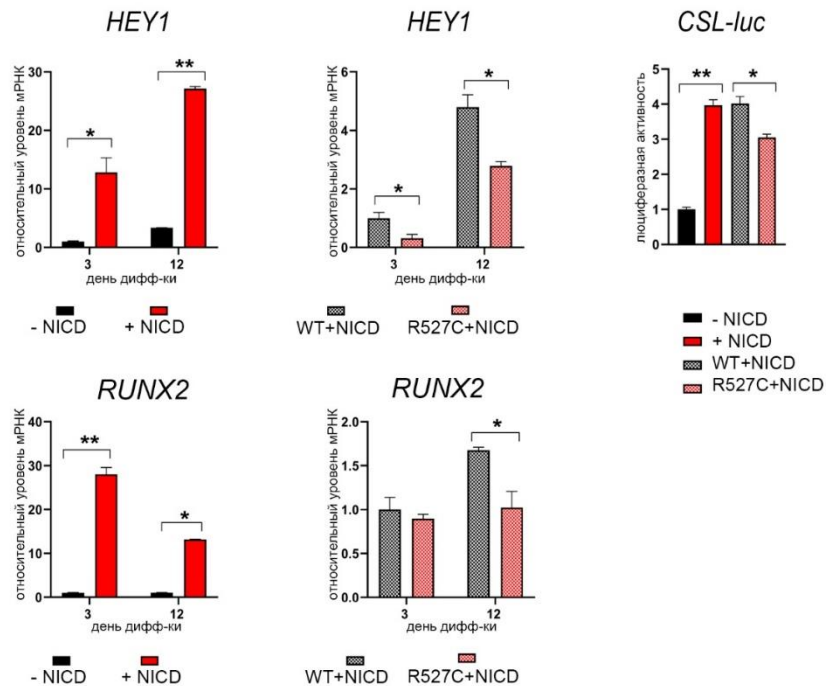


Рисунок 26. Мутация *LMNA* R527C приводит к подавлению экспрессии *HEY1* (верхняя панель, второй график) и *RUNX2* (нижняя панель, второй график) в МКС при активации Notch. Уровень мРНК *HEY1* измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Уровень мРНК остеогенного маркера *RUNX2* измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Дополнительно Notch-зависимую транскрипцию измеряли с помощью анализа активности люциферазного репортера CSL-luc (верхняя панель, третий график). Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD, * p < 0,05, ** p < 0,01 (Perrepelina et al., 2019).

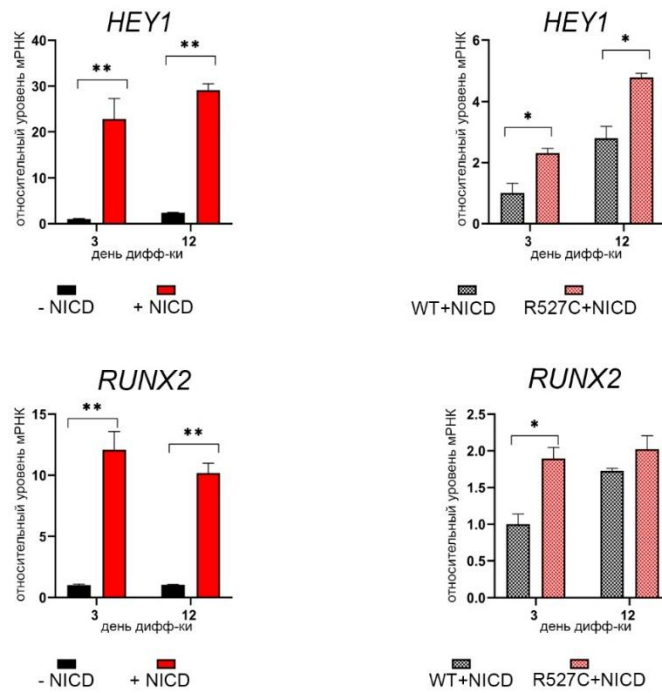


Рисунок 27. Мутация *LMNA* R527C приводит к повышению экспрессии *HEY1* (верхняя панель, второй график) и *RUNX2* (нижняя панель, второй график) в ИК при активации Notch. Уровень мРНК *HEY1* измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Уровень мРНК остеогенного маркера *RUNX2* измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Perrepelina et al., 2019).

3.3.5 Анализ экспрессии остеогенных маркеров и генов-мишеней сигнального пути Notch в разных линиях недифференцированных мезенхимных клеток

Мы провели сравнительный анализ уровней экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и остеогенных маркеров в четырех недифференцированных линиях (Рисунок 28). Полученные результаты показывают, что, несмотря на общее мезенхимное происхождение, ЭК, МКС, ГМК, ИК имеют очень разные уровни экспрессии анализируемых генов. Мы предполагаем, что этот начальный экспрессионный профиль каждого гена может влиять на эффект мутации в гене *LMNA* и действия Notch в разных типах клеток (Perrepelina et al., 2019).

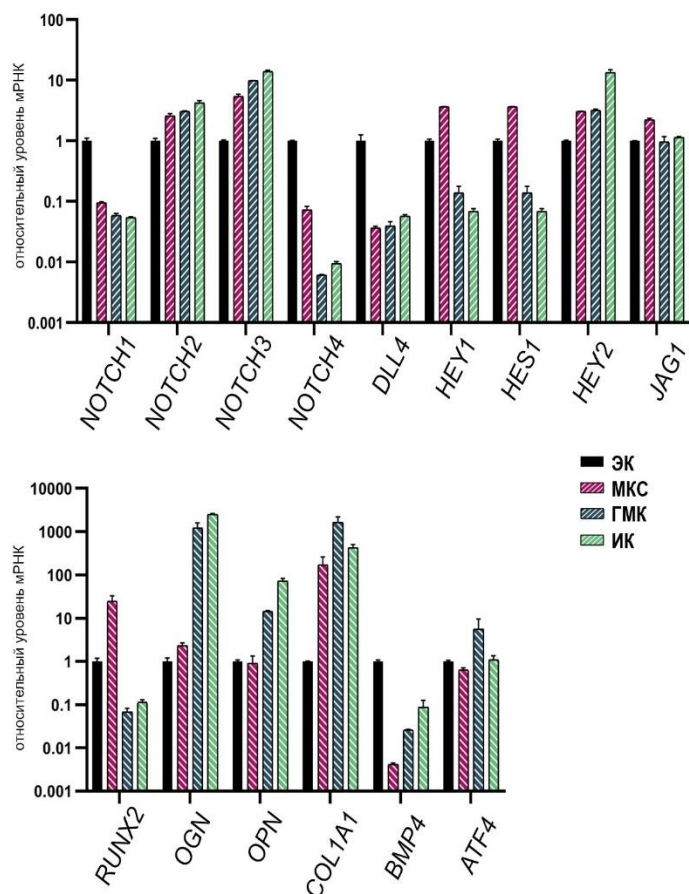


Рисунок 28. Вариабельность уровней экспрессии генов-мишеней Notch и остеогенных маркеров в различных типах недифференцированных мезенхимных клеток человека. Относительный уровень мРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены как среднее значение \pm SD (Perrepelina et al., 2019).

3.3.6 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния мутаций в гене *LMNA* (R527C и R471C) на процесс остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения

В данном разделе исследования нами были получены результаты о влиянии мутаций, ассоциированных с развитием костного фенотипа ламинапатий, на процесс остеогенной дифференцировки 4 типов клеток мезенхимного происхождения. Мы показали, что клетки близкие по происхождению (мезенхимное происхождение) могут по-разному реагировать на действие одной и той же мутации в гене *LMNA* в ходе остеогенной дифференцировки. Ранее в нашей лаборатории уже было показано на МСК человека, что мутации *LMNA*, связанные с различными фенотипическими проявлениями заболевания, оказывают разное влияние на процесс клеточной дифференцировки МСК (Malashicheva et al., 2015).

Мы показали, что действие *LMNA* мутаций на остеогенную дифференцировку может также зависеть от сигнального пути Notch. Сигнальный путь Notch является одним из ключевых

регуляторов, обеспечивающих развитие, дифференцировку и поддержание тканей во взрослом организме (Andersson et al., 2011). Известно, что Notch участвует в регуляции остеогенной дифференцировки (Zanotti and Canalis, 2016). Участие Notch во взаимодействии с ламинами А-типа было показано для прогерина, белка, возникающего в результате делеции гена *LMNA*, что приводит к преждевременному старению (Scaffidi and Misteli, 2008). Также было показано, что ламин А/С влияет на дифференцировку остеобластов (Tsukune et al., 2017) и может являться определяющим фактором в патогенезе как саркопении, так и остеопении (Tong et al., 2011). В нескольких работах описано, что экспрессия прогерина связана с функциональными нарушениями в МСК, приводящими к преждевременной остеогенной дифференцировке (Scaffidi and Misteli 2008; Blondel et al. 2014).

В нашем исследовании мы наблюдали различный ответ четырех клеточных линий на действие мутаций в ходе остеогенной дифференцировки. По-видимому, клетки, находящиеся на ранней стадии дифференцировки особо чувствительны к нарушению функционирования ламиновых филаментов, причем разные клеточные линии могут по-разному реагировать на эти изменения. Повышение или понижение экспрессии ламина А/С может приводить к изменению экспрессии генов и других регуляторных процессов в клетке (Piekarowicz et al., 2017).

Существуют свидетельства того, что мутации в ламине А/С, вызывающие заболевания, могут радикально изменить ламин-хроматиновые взаимодействия (Briand and Collas, 2020). Например, было показано, что мутация *LMNA* R482W, ассоциированная с липодистрофией, приводит к изменению пространственной конформации хроматина (Rønningen et al., 2015). Эти данные указывают на то, что ламин А/С участвует в регуляции экспрессии генов в процессе развития, посредством ограничения или доступности специфических областей ДНК для взаимодействия промотора с энхансером. Все эти данные свидетельствуют о том, что мутации в ламине А/С могут специфическим образом изменять судьбу клеток (Briand and Collas, 2020).

Результаты, полученные в данном исследовании, показывают, что ламина А/С оказывает строго тканеспецифическое влияние при одних и тех же условиях на различные типы мезенхимных клеток человека. Мы наблюдали широкий диапазон в уровнях экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и остеогенных маркеров между различными типами клеток. Мы предполагаем, что разные уровни экспрессии генов в различных линиях являются результатом уникальной для клеток пространственной ориентации геномных участков, взаимодействующих с ламинной, и являются ключевым фактором, определяющим судьбу клеток. Сравнение клеточных моделей, используемых в исследовании, позволяет нам ближе подойти к пониманию регуляторной роли ламинов А-типа, определяющих дифференцировочные решения клеток различных линий (Perrepelina et al., 2019).

3.4 Исследование эффекта пациент-специфической мутации в гене *LMNA* на процесс кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Основным подходом данного раздела исследовательской работы являлось создание модели ламин-ассоциированной кардиомиопатии с целью изучения механизмов, лежащих в основе нарушения процессов кардиогенной дифференцировки вследствие мутаций в гене *LMNA*. Для моделирования процесса кардиогенной дифференцировки нами были выбраны индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), несущие мутацию в гене *LMNA* (R249Q). Также в качестве контролей были использованы две линии ИПСК, полученные от здоровых доноров.

3.4.1 Получение и характеристика линии ИПСК, несущей *LMNA* R249Q мутацию

ИПСК получали путём репрограммирования пациент-специфичных Т-лимфоцитов с помощью CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, США), согласно рекомендациям производителя. Особенность этих вирусов состоит в том, что они являются РНК-вирусами, которые не встраивают свой генетический материал в ДНК клетки и элиминируются в течение месяца после трансдукции. Использование этих вирусов позволило избежать неконтролируемого встраивания трансгенов в геном клетки и их последующего влияния на дифференцировочную способность ИПСК.

Полученные колонии ИПСК обладали классической морфологией плюрипотентных стволовых клеток, т. е. образовывали округлые плоские колонии с четкими краями без признаков дифференцировки (Рисунок 29, А), а также демонстрировали позитивную окраску на щелочную фосфатазу (Рисунок 29, Б). Эндогенная экспрессия транскрипционных факторов – основных регуляторов плюрипотентности OCT3/4, NANOG, SOX2 была подтверждена методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве позитивного контроля экспрессии генов плюрипотентности была использована РНК, выделенная из линии эмбриональных клеток человека С16 (ЭК), полученных в институте Цитологии РАН (Рисунок 29, В). Также полученные ИПСК демонстрировали ядерную локализацию транскрипционных факторов OCT3/4 и NANOG, и наличие поверхностного маркера SSEA4 (Рисунок 29, Г). Анализ с помощью проточной цитометрии также выявил высокий уровень экспрессии поверхностного антигена SSEA4 (Рисунок 29, Д).

Устранение экзогенных факторов репрограммирования в линии ИПСК было подтверждено с помощью ОТ-ПЦР со специфическими праймерами (Таблица 3). В качестве позитивного контроля экспрессии трансгенов (генов репрограммирующего набора, содержащегося в геноме вирусов Сендай) использована РНК, выделенная из мононуклеаров периферической крови (PBMC),

трансдуцированных вирусами Сендай с использованием CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Рисунок 29, Е).

Для проведения генотипирования фрагмент гена *LMNA* амплифицировали методом ПЦР и секвенировали при помощи смеси BigDye Terminator v3.1 sequencing kit и севатора 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полученная ИПСК линия несла соответствующую пациент-специфичную мутации в гене *LMNA* (Рисунок 29, Ё).

Было показано, что полученная линия имеет нормальный кариотип (Рисунок 29, Ж). Анализ проводили с использованием микрочипов SurePrint G3 Human CGH Microarray 8x60K (Agilent Technologies) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ копийности участков генома был проведен с использованием программного обеспечения CytoGenomics Software v3.0.1.1 (Agilent Technologies, США) с импортированными базами данных копийности участков генома человека.

Для проверки способности ИПСК линий дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков использовали STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (Stem Cell Technologies, Канада). Дифференцированные клетки были окрашены с помощью метода иммуноцитохимии на маркеры эктодермы (β III tubulin), мезодермы (Brachyury) и энтодермы (GATA6) (Рисунок 29, З) (Perrepelina et al., 2020).

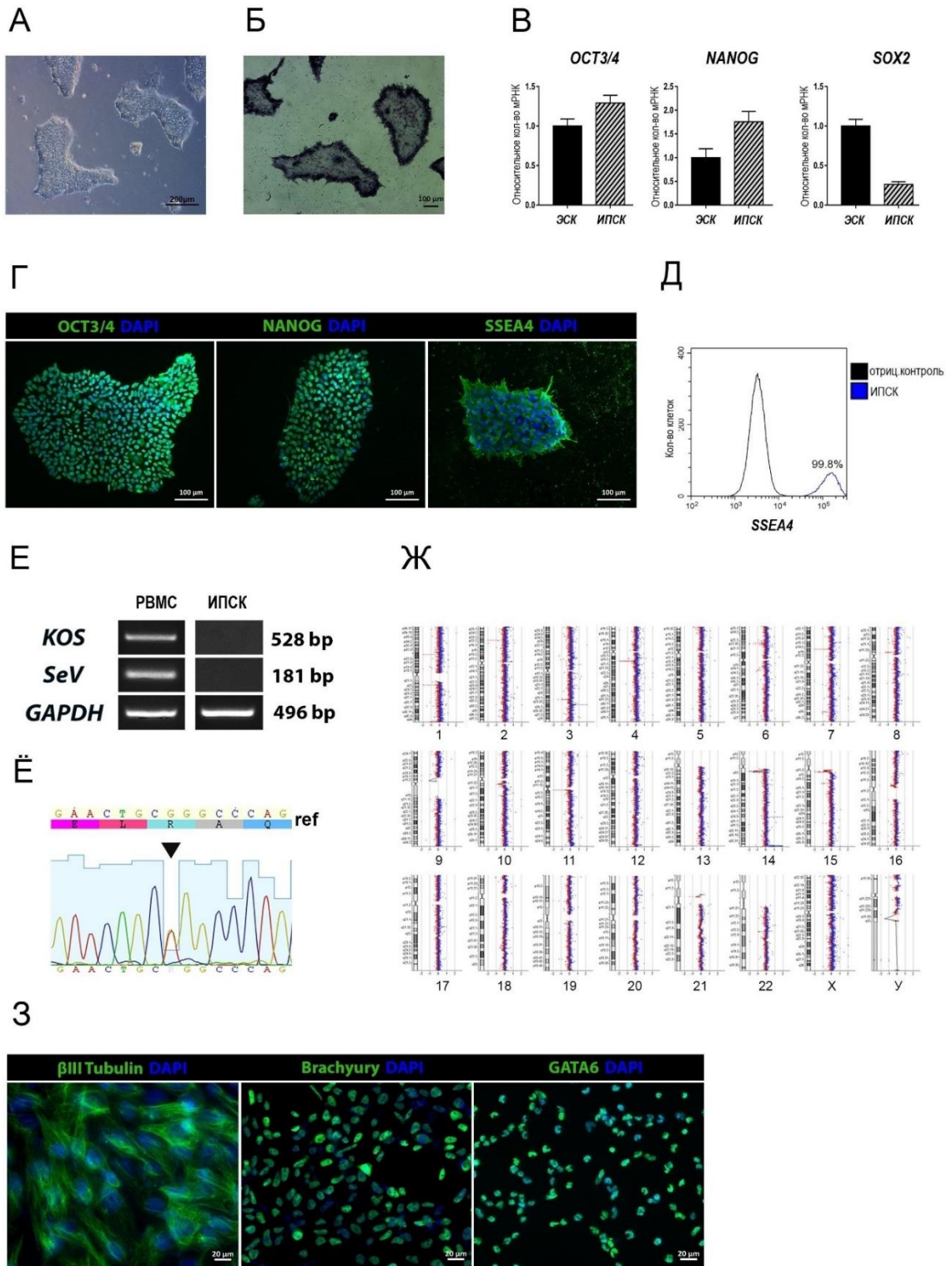


Рисунок 29. Характеристика ИПСК линии, несущей мутацию R249Q. (А) Внешний вид колонии ИПСК; (Б) окраска колоний ИПСК на щелочную фосфатазу; (В) Анализ экспрессии основных маркеров плюрипотентности методом ПЦР в режиме реального времени. ЭСК – эмбриональные стволовые клетки человека. (Г) Иммуноцитохимическая окраска линий ИПСК на маркеры плюрипотентности. (Д) Анализ наличия поверхностного антигена SSEA4 методом проточной цитометрии. (Е) Подтверждение устранения экзогенных факторов репрограммирования методом ОТ-ПЦР. РВМС – Peripheral blood mononuclear cells. (Ё) Проверка наличия пациент-специфической мутации в гене *LMNA* методом свенирования на Сенгеру. (Ж) Проверка кариотипа ИПСК методом молекулярного кариотипирования на чипах. (З) Иммуноцитохимическая окраска

дифференцированных ИПСК на маркеры трех зародышевых листков (β III tubulin – эктодерма, Brachyury – мезодерма, GATA6 – энтодерма) (Perepelina et al., 2020).

3.4.2 Создание модели кардиомиоцитов на основе ИПСК (ИПСК-КМЦ)

Дифференцировку полученных ИПСК с *LMNA* R249Q и контрольных линий ИПСК осуществляли по ранее отработанному в нашей лаборатории протоколу, основанному на модуляции сигнального пути Wnt/ β -катенин (Lian et al., 2012) с незначительными модификациями. Данный протокол дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты, включающий 5 основных этапов, отображён на Рисунке 30.

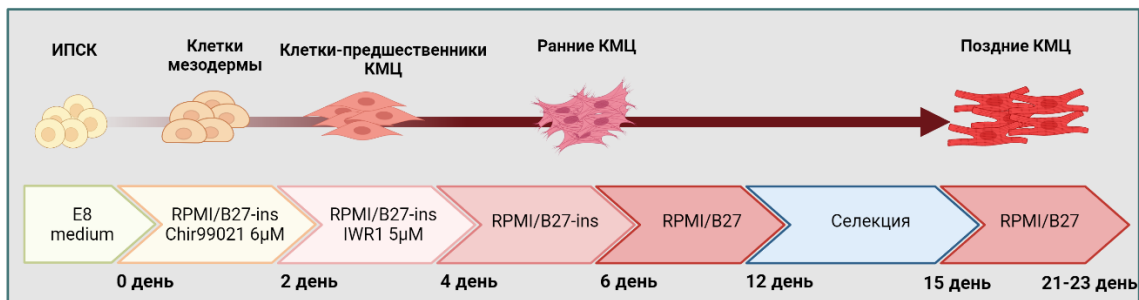


Рисунок 30. Схема протокола дифференцировки ИПСК в направлении кардиомиоцитов (Perepelina et al., 2022).

В первую очередь мы произвели проверку контрольной ИПСК линии и линии с мутацией в гене *LMNA* на способность дифференцироваться в кардиогенном направлении. С целью проследить динамику образования структурных компонентов дифференцирующихся кардиомиоцитов мы окрашивали клетки на разных стадиях дифференцировки (0, 2, 5, 7, 14 и 21 день). С помощью иммуноцитохимического окрашивания мы продемонстрировали присутствие основных кардиогенных маркеров – тропонина Т и тропомиозина как в контрольных клетках, так и в клетках с *LMNA* R249Q.

Иммуноцитохимическое окрашивание дифференцирующихся кардиомиоцитов выявило увеличение уровня экспрессии тропонина Т и тропомиозина во время дифференцировки в двух линиях ИПСК (контроль и R249Q). Мы отметили более раннюю экспрессию тропонина Т в ИПСК-КМЦ, несущих *LMNA* R249Q по сравнению с контролем (Рисунок 31). Каких-либо других изменений, связанных со структурными аномалиями ИПСК-КМЦ, несущими *LMNA* R249Q, не наблюдалось.

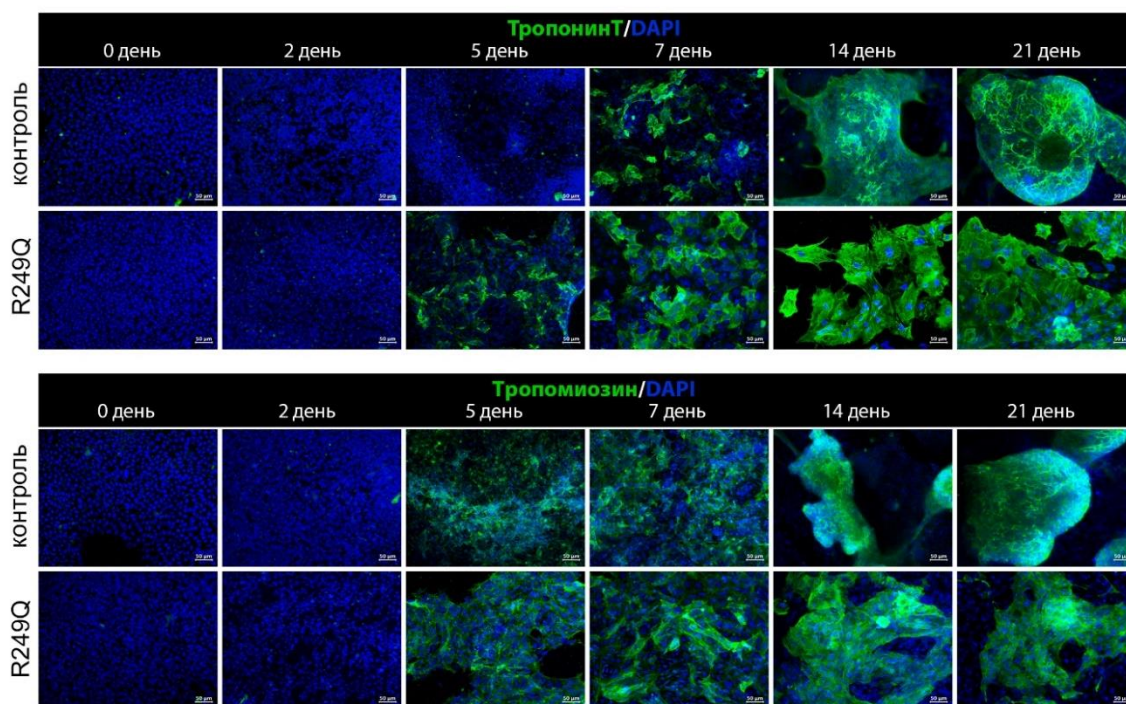


Рисунок 31. Иммуноцитохимическая окраска контрольных ИПСК (контроль) и ИПСК с *LMNA* R249Q мутацией (R249Q) на кардиогенные маркеры (тропонин Т и тропомиозин). Клетки были дифференцированы в кардиогенном направлении в течение 0, 3, 5, 7, 14 и 21 дня. Ядра дополнительно окрашены DAPI (синий) (Perrepelina et al., 2022).

Для того, чтобы исследовать изменение экспрессии кардио-специфичных генов в *LMNA* R249Q-КМЦ мы использовали метод ПЦР в режиме реального времени. Мы проанализировали экспрессию следующих генов: *TBXT*, *ISL1*, *GATA4*, *MEF2C* (кардиальные транскрипционные факторы), *TNNT2* и *MYH7* (саркомерные гены) в контрольных и *LMNA* R249Q ИПСК-КМЦ на разных стадиях кардиогенной дифференцировки (0, 2, 5, 7, 14, 21 день) (Рисунок 32).

На 2-й день дифференцировки отмечалось повышение уровня экспрессии *TBXT* (*Brachyury*), что отражает активацию образования мезодермы. Интересно, что *LMNA* R249Q вызывала повышение уровня экспрессии *TBXT* по сравнению с контрольными ИПСК-КМЦ. Экспрессия основных ранних кардио-специфичных генов (*ISL1*, *GATA4*, *MEF2C*) была обнаружена после 2-го дня дифференцировки. В частности, *LMNA* R249Q вызывала повышение уровня экспрессии *ISL1* на 5, 7, 14 и 21 день дифференцировки. *LMNA* R249Q ИПСК-КМЦ характеризовались более высоким уровнем экспрессии *GATA* на 7-й день и повышенным уровнем экспрессии *MEF2C* на 5, 7, 14-й день кардиогенной дифференцировки по сравнению с контролем.

Начало экспрессии *TNNT2* и *MYH7* (кардио-специфические маркеры поздней стадии) наблюдалась с 5-7 дня дифференцировки. *LMNA* R249Q мутация вызывала повышение уровня *TNNT2* в ИПСК-КМЦ на 5-й и 21-й день дифференцировки по сравнению с контрольными ИПСК-КМЦ. Экспрессия *MYH7* была значительно увеличена в *LMNA* R249Q ИПСК-КМЦ по сравнению с

контролем на 14-й и 21-й день дифференцировки.

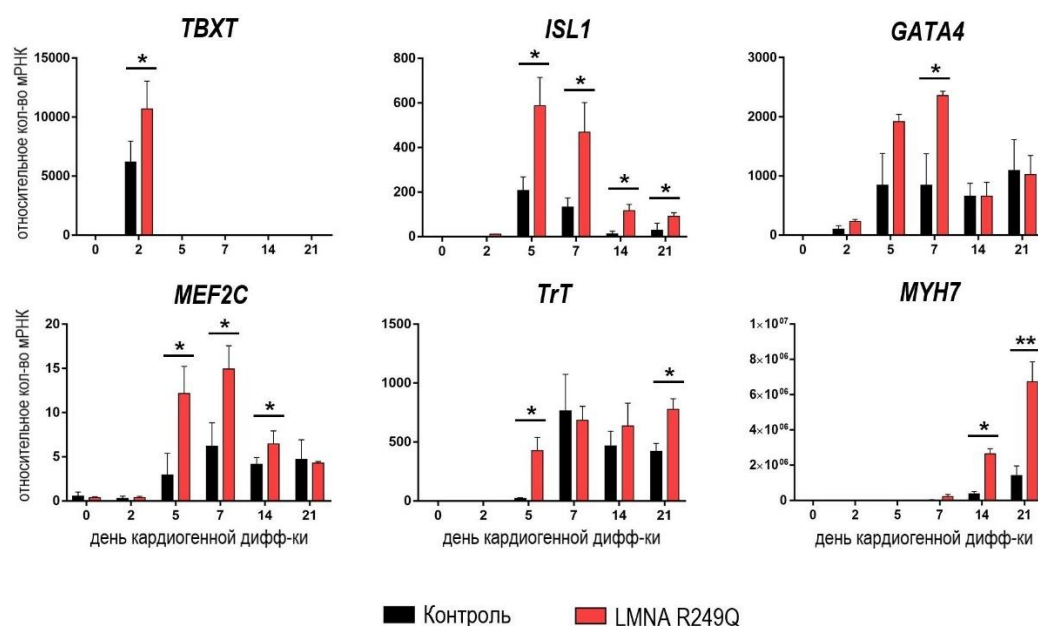


Рисунок 32. Сравнение экспрессии кардиогенных маркеров в КМЦ, полученных из ИПСК здоровых доноров (Контроль) и ИПСК с *LMNA* R249Q мутацией (*LMNA* R249Q). ИПСК дифференцировались в течение 0, 2, 5, 7, 14 и 21 дня. Уровень мРНК измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены в виде среднего \pm SD, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Perpelina et al., 2022).

Таким образом, *LMNA* R249Q ИПСК-КМЦ продемонстрировали повышенный уровень экспрессии мезодермальных и кардио-специфичных факторов транскрипции, а также саркомерных генов, что указывает на общую дисрегуляцию профиля экспрессии генов ИПСК-КМЦ, вызванную патогенным влиянием мутации *LMNA* R249Q (Perpelina et al., 2022).

3.4.3 Оценка влияния *LMNA* R249Q мутации на экспрессионный профиль КМЦ на поздней стадии дифференцировки

С целью выяснения, может ли *LMNA* R249Q влиять на экспрессию генов в зрелых КМЦ, мы сосредоточились на поздней фазе кардиогенной дифференцировки (21 день) (Рисунок 33). Мы исследовали экспрессию генов, кодирующих белки, поддерживающие саркомерную структуру - *ACTN2* и *FLNC* (Рисунок 33, А), и обнаружили значительную активацию этих генов в КМЦ, несущих *LMNA* R249Q (R249Q), по сравнению со здоровыми КМЦ (контроль). Кроме того, мы наблюдали достоверное повышение уровня экспрессии *DMPK*, кодирующего протеинкиназу миототической дистрофии (Рисунок 33, Б). Также мы наблюдали повышенный уровень экспрессии гена *SCN5A*, кодирующего кардио-специфичный потенциал-зависимый натриевый канал Nav1.5, в то время как каких-либо изменений в экспрессии генов, кодирующих ионные каналы *SCN4B*, *TRPM4*

и *HCN4*, не было обнаружено (Рисунок 33, В). Было обнаружено, что гены, кодирующие компоненты межклеточных контактов, такие как *PKP2*, *DSP* и *GJA5*, подавляются в КМЦ с *LMNA* R249Q (Рисунок 33, Г) (Perepelina et al., 2022).

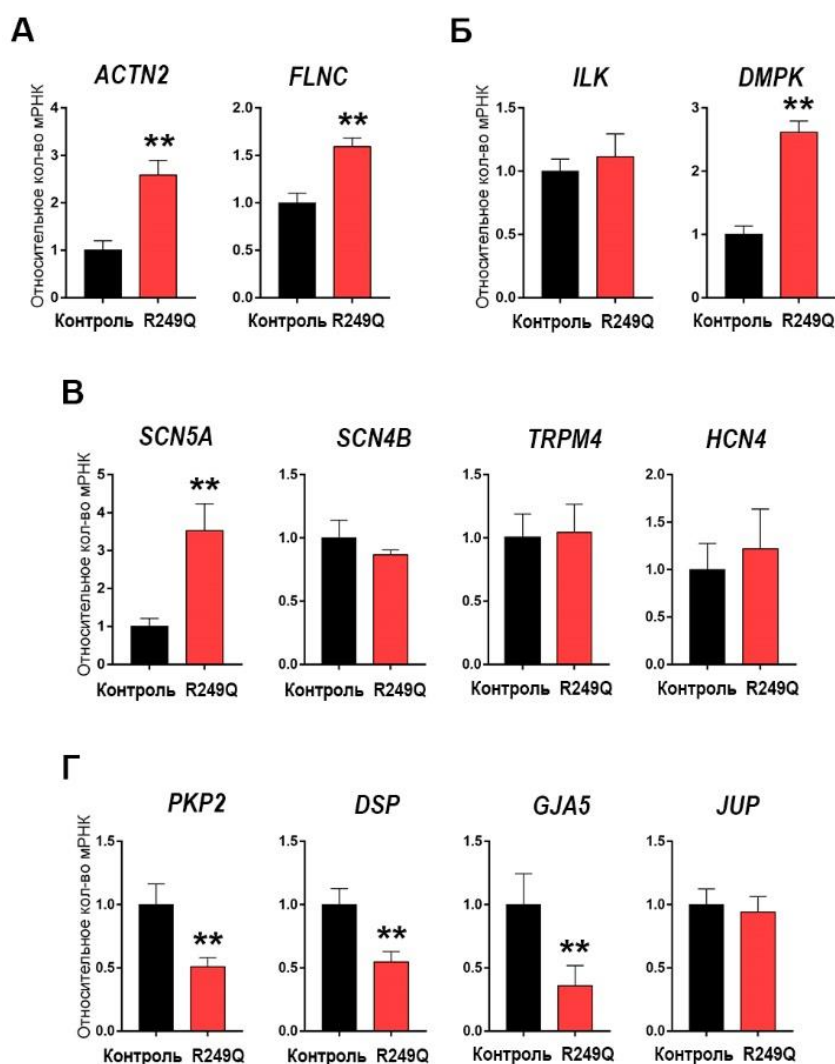


Рисунок 33. Сравнение экспрессии кардиогенных маркеров в КМЦ, полученных из ИПСК здоровых доноров (Контроль) и ИПСК с *LMNA* R249Q мутацией (R249Q). ИПСК дифференцировались в течение 21 дня. (А) Оценка экспрессионного уровня генов, кодирующих структурные саркомерные белки КМЦ. (Б) Оценка экспрессионного уровня генов, кодирующих регуляторные киназы КМЦ. (В) Оценка экспрессионного уровня генов, кодирующих ионные каналы КМЦ. (Г) Оценка экспрессионного уровня генов, кодирующих белки, входящие в состав интеркалирующих дисков КМЦ. Уровень мРНК измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Результаты представлены в виде среднего \pm SD, ** $p < 0,01$ (Perepelina et al., 2022).

3.4.4 Электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов, полученных из ИПСК пациента с мутацией *LMNA* R249Q.

Биофизические параметры натриевого тока были получены с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в отведении от целой клетки (whole-cell configuration). Плотность натриевого тока была получена посредством нормализации значений силы тока на значение ёмкости мембраны, которая компенсировалась индивидуально для каждой клетки.

Во всех опытных группах наблюдались типичные следы натриевых токов (Рисунок 34, А). Пиковая плотность натриевого тока в двух контрольных группах ИПСК-КМЦ существенно не отличалась друг от друга (Рисунок 34, Б, Таблица 4). ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q продемонстрировали заметное снижение пиковой плотности тока по сравнению с контрольными группами. В контрольных ИПСК-КМЦ максимальный ток натрия наблюдался при -25 мВ, тогда как в ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q максимальный ток был при более деполяризованном потенциале -20 мВ (Рисунок 35, В). Хорошо известно, что снижение плотности тока может быть вызвано изменениями в работе каналов, а также нарушениями транспорта белков.

Для выяснения причин снижения плотности тока натрия мы исследовали кинетические параметры стационарных кривых активации и инактивации. Нами был выявлен сдвиг кривой стационарной активации в сторону деполяризации в ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q по сравнению с контролем (Рисунок 34, Г, Таблица 4). Это изменение в свойствах ворот канала указывает на потерю функции (loss-of-function) натриевого канала в клетках пациента. В отличие от этого, мы также обнаружили, что кривая стационарной инактивации была также смещена в сторону деполяризованного потенциала (Рисунок 34, Д, Таблица 4), что характерно для фенотипа с приобретением функции (gain-of-function phenotype).

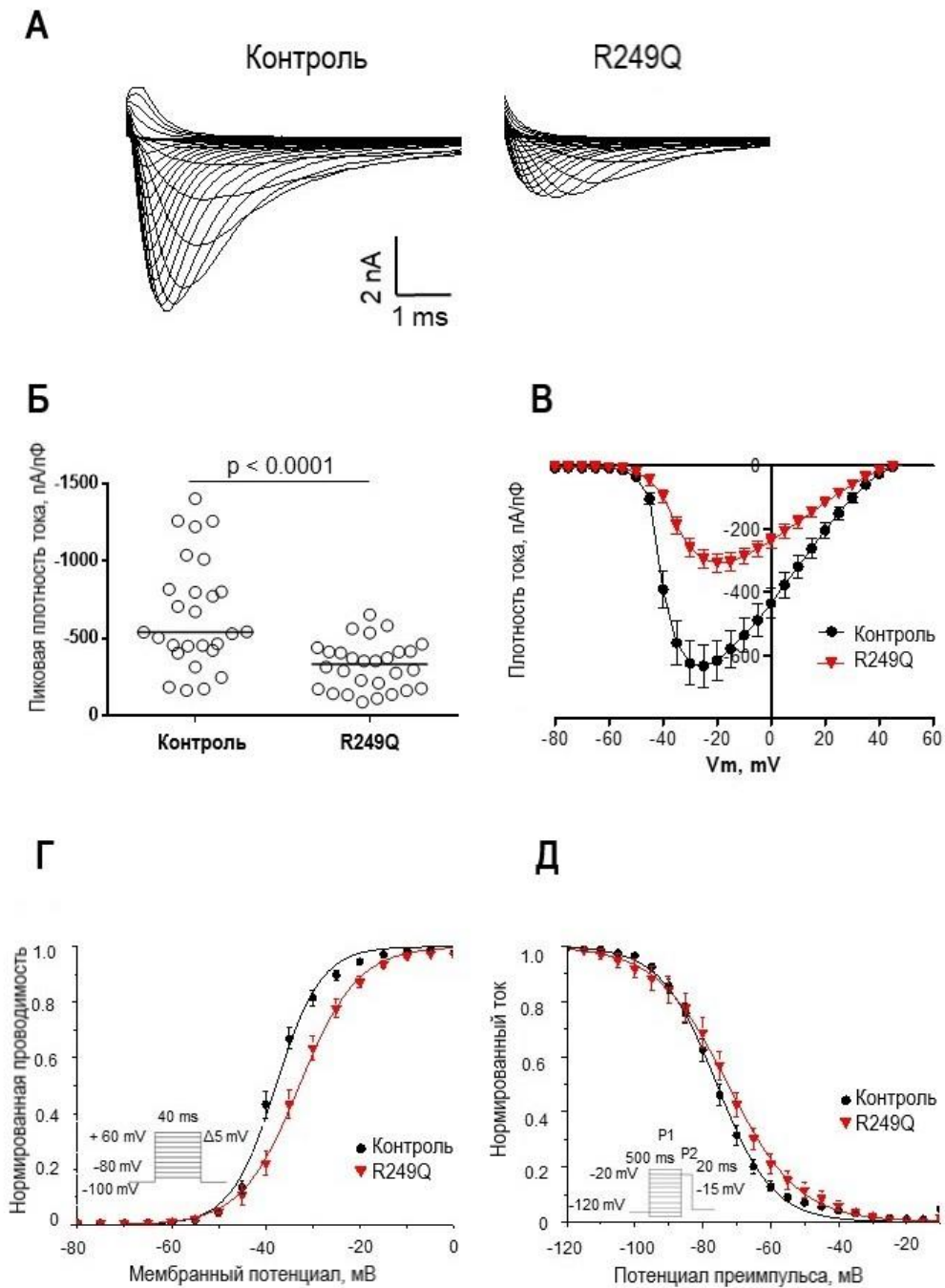


Рисунок 34. Функциональная характеристика активности натриевого канала в ИПСК-КМЦ, несущих *LMNA* R249Q. (А) Типичные следы тока натрия в ИПСК-КМЦ. (Б) Пиковые плотности тока натрия для контроля и ИПСК-КМЦ пациента с R249Q. Данные представлены как медианы. ИПСК-КМЦ пациента продемонстрировали заметное снижение плотности тока натрия. (В) Соотношение ток-напряжение натриевого канала в контроле и ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q. (Г) Зависимость стационарной активации от напряжения для контроля и ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q. ИПСК-КМЦ пациента продемонстрировали замедление активацию. (Д) Зависимость стационарной инактивации от напряжения для контроля и ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q. ИПСК-КМЦ пациента продемонстрировали нарушение инактивации (Perrepelina et al., 2022).

		Контроль	n	R249Q	n	p
Плотность тока при -20 мВ	пА/пФ	-652.9 ± 68.4	27	-324.9 ± 29.3	28	p < 0.0001

Стационарная активация	$V_{1/2}$, mV	-37.7 ± 0.8	27	-33.0 ± 1.2	28	0.002
	k	4.0 ± 0.3		4.7 ± 0.2		0.02
Стационарная инактивация	$V_{1/2}$, mV	-75.7 ± 1.3	23	-73.4 ± 2.5	22	0.09
	k	7.1 ± 0.3		8.0 ± 0.4		0.07

Таблица 4. Биофизические параметры натриевого тока в ИПСК-КМЦ, полученных в контрольных и ИПСК-КМЦ пациента. Ёмкость. Контроль: 9.5 ± 0.85 pF; пациент: 11.4 ± 0.8 pF. $p=0.07$, (Perrepelina et al., 2022).

Таким образом, *LMNA* R249Q мутация приводит к изменению функциональной активности натриевых каналов ИПСК-КМЦ, отражая комплексное влияние мутации *LMNA* на электрофизиологические свойства кардиомиоцитов пациента. Следовательно, наблюдаемые изменения характеристик натриевого тока можно рассматривать как возможный механизм развития аритмии (Perrepelina et al., 2022).

3.4.5 Обсуждение результатов, полученных при исследовании влияния *LMNA* R249Q мутации на процесс кардиогенной дифференцировки ИПСК

Известно, что одним из наиболее частых проявлений ламинопатий являются нарушения сердечного ритма и проводимости, в том числе фибрилляция предсердий, желудочковая аритмия, а также внезапная сердечная смерть. Дисфункция сердечной системы может возникать как отдельное заболевание, так и быть сопутствующей патологией (Chaffee et al. 2014; Chandar et al. 2010; Chen et al. 2019; Corrigan et al. 2005; Fatkin et al. 1999). Известно, что ламин A/C является ключевым регулятором экспрессии генов (Osmanagic-Myers and Foisner, 2019). Поэтому мы проанализировали профиль экспрессии кардио-специфичных генов в ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q на поздней стадии кардиогенной дифференцировки. Мы показали, что мутация приводит к повышению экспрессии генов, кодирующих белки цитоскелета (актин и филламин С). Сообщалось, что филламин С и актин вносят вклад в кортикальный цитоскелет, тем самым защищая структуру кардиомиоцитов от механического стресса (Fujita et al., 2012). Учитывая, что ламин A/C взаимодействует с актином посредством LINC комплекса и участвует в регуляции структурной архитектуры сократительной ткани (Swift et al., 2013), мутантный ламин A/C может влиять на организацию саркомеров. Кроме того, ламин A/C, участвующий в регуляции экспрессии генов, может изменять транскрипционный статус клетки вследствие *LMNA* мутаций.

В данной работе мы продемонстрировали изменение экспрессии кардио-специфичных генов в ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q на разных стадиях кардиогенной дифференцировки. Поскольку мутантный ламин теряет способность к правильному встраиванию в ядерную ламину, следовательно, взаимодействие ламин-хроматин нарушается, что влечет за собой изменение экспрессии генов, включенных в LAD (Briand and Collas, 2020). В результате может произойти более ранний запуск программы дифференциации. В настоящем исследовании мы обнаружили

повышенную способность к кардиогенной дифференцировке ИПСК, несущих мутацию *LMNA* R249Q. В более раннем исследовании было описано активирующее действие специфичных *LMNA* мутаций на адипогенную и остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека (Malashicheva et al., 2015). Другое исследование установило, что мутации *LMNA* G232E/R482L вызывают нарушение регуляции мышечной дифференцировки мышечных миобластов линии C2C12 (Ignatieva et al., 2020). Учитывая вышесказанное, можно предположить, что ламин A/C играет существенную роль в определении судьбы клеток, а мутация *LMNA* R249Q приводит к дисрегуляции дифференцировочной программы в модели ИПСК-КМЦ.

Несмотря на известные факты о клинических проявлениях сердечных аритмий и нарушений проводимости, связанных с мутациями *LMNA*, имеется лишь несколько работ, посвященных влиянию *LMNA* мутаций на функционирование ионных каналов сердца. В настоящем исследовании мы определили, что в ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q электрофизиологические функции сердечного натриевого канала были заметно изменены.

В похожей работе с использованием модели ИПСК-КМЦ был продемонстрирован ингибирующий эффект мутации *LMNA* K219T на функцию Nav1.5. Мутация *LMNA* K219T приводила к снижению плотности тока натрия и более медленной скорости проводимости в сочетании со снижением экспрессии *SCN5A* (ген, кодирующий Nav1.5), что указывает на нарушение активности каналов Nav1.5 (Salvarani et al., 2019). В нашем исследовании показан аналогичный эффект мутации *LMNA* R249Q на параметры Nav1.5: снижение плотности натриевого тока и изменения кинетики натриевого тока. Учитывая генотип-фенотипическую корреляцию между мутацией в гене *LMNA* и результирующим фенотипом, подразумевается, что патологии, вызванные близко локализованными заменами (обе мутации локализованы в центральном род домене ламина A/C), должны иметь общий механизм заболевания (Scharner et al., 2010). Однако, в отличие от результатов Salvarani, в настоящем исследовании экспрессия *SCN5A* в ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q была повышена, что может быть связано с компенсаторным механизмом. Вероятно, даже близко локализованные мутации в *LMNA* не обладают полностью идентичными патогенетическими механизмами, а может различаться на уровне эпигенетической регуляции экспрессии *SCN5A*.

Также остается открытым вопрос, является ли дисфункция натриевого тока первичным или вторичным следствием действия мутации *LMNA* R249Q. Согласно данным экспрессии, ИПСК-КМЦ с *LMNA* R249Q имеют пониженные уровни *PKP2*, *DSP* и *GJA5*. Роль белков клеточных контактов в правильной локализации и функционировании каналов во вставочных дисках хорошо известна. Показано, что плакофиллин и десмоплакин интегрированы в макромолекулярный комплекс с Nav1.5 в пуле интеркалирующих дисков натриевых каналов (Shy et al., 2013). Было показано, что Nav1.5 совместно локализуется с плакофиллином во вставочных дисках, а потеря экспрессии *PKP2* (ген, кодирующий плакофиллин 2) приводит к снижению тока натрия в культуре кардиальных миоцитов

(Sato et al. 2009). Исследования влияния мутаций *PKP2* на ток натрия на модели ИПСК-КМЦ подтвердили, что гаплонедостаточность *PKP2* может приводить к снижению активности натриевых каналов (Khudiakov et al., 2020). Таким образом, в текущем исследовании мы поддерживаем гипотезу о том, что нарушение экспрессии *PKP2* может привести к дисфункции Nav1.5.

Наряду с предыдущей электрофизиологической характеристикой ИПСК-КМЦ с мутацией *DSP* H1684R, приводящей к снижению токов натрия и кальция (Gusev et al., 2020), наши результаты подчеркивают важность белков межклеточных контактных в правильном функционировании натриевого канала. Роль нарушенной экспрессии *GJA5* в дисфункции натриевых каналов остается неясной, несмотря на сообщения об ассоциации мутаций в *GJA5* с мерцательной аритмией (Baï, 2014). В совокупности, снижение тока натрия можно рассматривать как следствие дефицита *PKP2* и *DSP* в клетках пациента. Точные молекулярные механизмы, лежащие в основе электрофизиологических дефектов при *LMNA*-ассоциированной кардиомиопатии, остаются неясными и требуют дальнейших исследований.

Таким образом, можно сказать, что наши результаты подтверждают фундаментальную роль ламина A/C в кардиогенной дифференцировке, регуляции экспрессии маркеров кардиогенеза и электрофизиологических свойств сердечного натриевого канала Nav 1.5 (Perepelina et al., 2022).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ламинопатии представляют собой группу тяжелых наследственных заболеваний, которые часто проявляют себя тканеспецифично, т. е. поражают преимущественно один тип ткани. Именно такие формы ламинопатий остаются на сегодняшний день недостаточно изученными в отношении их патогенетических механизмов. Поэтому для исследования механизмов развития ламинопатий в данном исследовании использовались точечные мутации в гене *LMNA*, ассоциированные с той или иной тканеспецифичной формой заболеваний.

Тот факт, что разные мутации в гене *LMNA* вызывают различные тканеспецифичные нарушения, дает основания полагать, что они играют существенную роль в дифференцировке клеток. Действительно, роль ламинов А-типа в процессах клеточной дифференцировки уже была показана с использованием мышинных моделей, нокаутных по гену *Lmna* (Zhang et al., 2013), на моделях стволовых клеток, у которых транскрипция гена *Lmna* ингибирована с помощью миРНК (Akter et al., 2009). Однако потеря функционирования ламинов не отвечает тем условиям, которые требуются для развития тканеспецифичных форм ламинопатий. Мутации, вызывающие аутосомно-доминантные формы ламинопатий, обуславливают приобретение новых функций ламином А/С (gain-of-function), а не приводят к подавлению синтеза и функционирования эндогенных форм ламин А/С в клетке. Известно, что введение экзогенного *LMNA* приводит к синтезу белка, который может «конкурировать» с нормальной формой за встраивание в ядерную ламину (Boguslavsky et al., 2006). Это обосновывает экспериментальное построение данного исследования, в котором при помощи введения экзогенных форм ламин возможно моделировать различные формы ламинопатий и исследовать тканеспецифические нарушения, которые возникают под действием той или иной мутации в гене *LMNA* в процессе дифференцировки клеток.

Так как при мутациях ламин в большей мере страдают ткани мезенхимного происхождения, в частности мышечная, жировая и костная, мы использовали в качестве дифференцировочной модели клетки мезенхимного происхождения. Так, были исследованы нарушения процессов миогенной, адипогенной и остеогенной дифференцировок, вызванные тканеспецифическими мутациями в гене *LMNA*, на разных клеточных моделях: мышинные миобласты линии C2C12 и первичные сателлитные клетки мыши (мышечная модель); МКС человека (адипогенная модель); МКС, ЭК, ГМК и ИК человека (остеогенная модель). Кроме того, в качестве модели кардиогенной дифференцировки мы использовали ИПСК, которые, как было показано ранее, успешно дифференцируются в кардиомиоциты (BurrIDGE et al., 2014; Lian et al., 2013).

В целом полученные результаты подтверждают тканеспецифичный характер развития

ламинопатий. Мутации индивидуальным образом приводят к дисрегуляции дифференцировочных процессов, как на уровне экспрессии генов, так и на морфологическом уровне. В частности, мы показали, что мутации G232E и R571S в гене *LMNA* нарушают процесс мышечной дифференцировки миобластов линии C2C12 и сателлитных клеток мышцы: происходит нарушение процесса образования миотрубок, а также нарушение экспрессии миогенных маркеров. Наибольший ингибирующий эффект на мышечную дифференцировку оказывает мутация *LMNA* G232E, тем самым подтверждая тканеспецифичный характер развития ламинопатий (Перепелина и др., 2017). В случае исследования влияния *LMNA* R482L мутации на адипогенную дифференцировку, мы также продемонстрировали ингибирующее действие мутации на дифференцировку МКС человека (Perrepelina et al., 2018). *LMNA* R527C и *LMNA* R471C мутации, как было показано, также негативно влияют на процесс остеогенной дифференцировки мезенхимных клеток, однако степень и характер данного влияния различен в разных клетках мезенхимного происхождения (Perrepelina et al., 2019). Результаты по исследованию эффекта мутации *LMNA* R249Q на кардиогенную дифференцировку ИПСК продемонстрировали, что ИПСК пациента обладают повышенным потенциалом к кардиогенной дифференцировке, однако на электрофизиологическом уровне мутация приводит к замедлению кинетики Nav 1.5 канала и снижению плотности натриевого тока, по сравнению с контрольными КМЦ. Также наблюдалось снижение экспрессии генов, кодирующих белки, входящие в состав десмосом (*PKP2*, *DSP* и *GJA5*), а также повышение уровня экспрессии *SCN5A*, кодирующего сердечный Nav 1.5. Мы предполагаем, снижение экспрессии *PKP2*, *DSP* и *GJA5* вследствие *LMNA* мутации, влияют на функционирование Nav 1.5, повышение экспрессии *SCN5A* можно рассматривать в качестве компенсаторного механизма (Perrepelina et al., 2022).

В нашей работе исследуемые мутации приводят к изменению дифференцировочных свойств клеток, выбранных в качестве модели. Однако нельзя сказать, что эти же мутации будут оказывать тот же эффект на дифференцировку клеток в других клеточных моделях. В этом и заключается суть тканеспецифического характера действия ламиновых мутаций. Так, например, в работе ранее выполненной в нашей лаборатории (Malashicheva et al., 2015), было показано, что при введении разных тканеспецифичных мутаций в МСК не наблюдали какого-то одного эффекта на дифференцировку клеток. Введённые мутации не выключают функции ламина, а модулируют их таким образом, что в случае некоторых мутаций эффективность дифференцировки не только не снижается, но даже может увеличиваться. На основе наших результатов и результатов, полученных в других исследованиях, можно предположить, что наблюдаемый различный эффект от мутаций может говорить о том, что дифференцировочный потенциал клеток регулируется каким-то балансом ламиновых форм, и нарушение этого баланса может приводить к сдвигу дифференцировки в ту или иную сторону. Вероятно, поэтому разные мутации одного и того же гена приводят к изменению

дифференцировочного потенциала и как следствие - к разным фенотипам заболевания.

Также значительную роль в дифференцировке клеток играют эпигенетические механизмы. Как уже отмечалось, ламины могут взаимодействовать с определёнными участками генома (LADs) и влиять на экспрессию генов. Работы Lund с соавторами показали, что в зависимости от характера данных взаимодействий в стволовых клетках может запускаться программа дифференцировки в том или ином направлении (Lund et al., 2013; Lund and Collas, 2013). По-видимому, в процессе дифференцировки клеток происходят пространственные перестроения геномных участков по направлению к ламине или от нее. Таким образом, гены, входящие в LADs, связанные с ламинной, могут переходить в репрессивное состояние, и напротив гены, диссоциирующие от ламины могут переходить в активно-транскрибируемое состояние. Так, гены, необходимые для специфической дифференцировки, активируются путем отделения участков генома от ядерной ламины.

Нарушение правильной укладки ламина A/C вследствие мутаций *LMNA* приводят к нарушению целостности и функции ядерной ламины, а как следствие, нарушается правильное взаимодействие хроматина с ламинами. Эти конформационные изменения влекут за собой дисрегуляцию экспрессии генов, в том числе генов, ответственных за дифференцировку (Melcer and Meshorer, 2010; Scaffidi and Misteli, 2008; Zhang et al., 2019). Все эти реорганизации генома зависят от стадии клеточного цикла и различаются в разных клетках (Bitman-Lotan and Orian, 2021; Shah et al., 2021).

Еще одной целью работы было исследование совместного действия мутаций в гене *LMNA* и сигнального пути Notch в процессе дифференцировки клеток. Сигнальный путь Notch является одним из базовых путей межклеточной сигнализации, определяющих клеточную судьбу, а также соотношение стволовых свойств и способности клеток к дифференцировке. Как и в случае многих других сигнальных путей, Notch действует в самых разных клетках и типах тканей, и результат его воздействия сильно зависит от клеточного окружения. Наши данные позволили высказать предположение о возможности взаимодействия ламинов A-типа и компонентов сигнального пути Notch, а также о том, что изменение дифференцировочных свойств клеток с мутациями в гене *LMNA* может происходить при участии Notch. В данном исследовании мы демонстрируем, что сверхактивация сигнального пути Notch с помощью введения активированного домена рецептора Notch (NICD) ингибирует процесс дифференцировки стволовых клеток в адипогенном направлении (Perrepelina et al., 2018). В то же время, активация Notch активирует остеогенную дифференцировку МКС и ИК (Perrepelina et al., 2019). Существует предположение о том, что гены - компоненты сигнального пути Notch, сами могут непосредственно физически взаимодействовать с ядерной ламинной и/или их регуляция связана с изменениями в эпигенетических модификациях (Meshorer and Gruenbaum, 2008). Возможно, что некоторые мутации таким образом, могут нарушать сайты взаимодействия ламинов с генами-мишенями сигнального пути Notch.

В данном исследовании были изучены молекулярные механизмы развития ламинопатий с применением различных подходов. На основе полученных результатов можно утверждать, что дифференцировочные решения клетки зависят от многих факторов, в том числе от определенной мутации *LMNA*, степени активности сигнального пути Notch, а также от происхождения самой клетки. Важным является изучить совокупность возможных изменений в клетке, происходящих вследствие возникновения мутаций *LMNA*, в том числе и эпигенетические изменения, а также нарушения взаимодействия ламин с компонентами сигнальных путей, а также оценить, как эти изменения влияют на процессы дифференцировки. Такие исследования дадут возможность понять общую картину молекулярных процессов в клетке, приводящих к развитию этих тяжёлых заболеваний.

В результате наших исследований в соответствии с поставленными задачами были сделаны следующие **выводы**:

1. Мутации *LMNA* G232E и *LMNA* R571S приводят к нарушению мышечной дифференцировки первичных сателлитных клеток мышцы и клеток линии C2C12.
2. Мутация *LMNA* R482L подавляет процесс адипогенной дифференцировки за счет снижения активности сигнального пути Notch.
3. Мутация *LMNA* R527C подавляет остеогенную дифференцировку и активность Notch в мезенхимных клетках сердца человека; в то же время мутация *LMNA* R527C активирует остеогенную дифференцировку и Notch в интерстициальных клетках аортального клапана человека.
4. Ламины А-типа в кооперации с сигнальным путем Notch влияют тканеспецифичным образом на процесс дифференцировки клеток.
5. Мутация *LMNA* R249Q приводит к изменению экспрессионного профиля кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента: повышению экспрессии генов, кодирующих структурные белки; снижению экспрессии генов, кодирующих белки десмосом.
6. Мутация *LMNA* R249Q приводит к изменению электрофизиологических свойств кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: снижению пиковой плотности натриевого тока, замедлению стационарной активации натриевого тока, замедлению стационарной инактивации натриевого тока.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CSL – CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1 (фактор транскрипции, который отвечает за активацию Notch генов)
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- DMEM – питательная среда Игла в модификации Дульбекко
- LAD – lamina associated domain
- LMNA* – ген ламина A/C
- NICD – Notch IntraCellular Domain,
- NLS – nuclear localization signal
- PEI – polyethylenimine hydrochloride
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГМК – гладкомышечные клетки
- ДМСО (диметилсульфоксид) – криопротектор
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК – интерстициальных клетки
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- ИПСК-КМЦ – кардиомиоциты, полученные на основе ИПСК
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- КМЦ – кардиомиоциты
- ЛС – лошадиная сыворотка
- МКС – мезенхимные клетки сердца человека
- МДЭД – миодистрофия Эмери-Дрейфуса
- МСК – мезенхимные стволовые клетки
- ПФА – параформальдегид
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ФБС – фетальная коровья сыворотка
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ЭК – эндотелиальные клетки аорты человека

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Богданова, М.А., Гудкова А.Я., Забирник, А.С., Игнатъева, Е.В., Дмитриева, Р.И., Смолина, Н.А., Костарева, А.А., Малашичева, А.Б. 2014. Роль ядерных ламинов А/С в остеогенной дифференцировке мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. *Цитология*. 56 (4): 260–266.
- 2 Малашичева, А.Б., Сабирова, А.А., Козырев, И.А., Головкин, А.С., Худяков, А.А., Костарева, А.А. 2015. Сравнительная характеристика стволовых клеток сердца, полученных из миокарда детей и взрослых. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 14 (3): 52–258.
- 3 Перепелина, К.И., Смолина, Н.А., Забиник, А.С., Дмитриева, Р.И., Малашичева, А.Б., Костарева, А.А. 2017. Влияние мутаций в гене LMNA на миогенную дифференцировку первичных сателлитных клеток и клеток линии C2C12. *Цитология* 59 (2): 117–124.
- 4 Adam, S.A., Butin-Israeli, V., Cleland, M.M., Shimi, T., Goldman, R.D., 2013. Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors. *Nucl. (United States)* 4, 142–150.
- 5 Agarwal, A.K., Fryns, J.P., Auchus, R.J., Garg, A., 2003. Zinc metalloproteinase ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1995–2001.
- 6 Ahn, J., Jo, I., Kang, S. mi, Hong, S., Kim, S., Jeong, S., Kim, Y.H., Park, B.J., Ha, N.C., 2019. Structural basis for lamin assembly at the molecular level. *Nat. Commun.* 10, 1–12.
- 7 Akter, R., Rivas, D., Geneau, G., Drissi, H., Duque, G., 2009. Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function. *J. Bone Miner. Res.* 24, 283–293.
- 8 Alcorta-Sevillano, N., Macías, I., Rodríguez, C.I., Infante, A., 2020. Crucial Role of Lamin A/C in the Migration and Differentiation of MSCs in Bone. *Cells*. 26;9(6):1330.
- 9 Andersson, E.R., Sandberg, R., Lendahl, U., 2011. Notch signaling: Simplicity in design, versatility in function. *Development* 138, 3593–3612.
- 10 Andrés, V., González, J.M., 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J. Cell Biol.* 187, 945–957.
- 11 Bai, D., 2014. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms. *FEBS Lett.* 588, 1238–1243.
- 12 Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., Vaubourdolle, M., 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat. Protoc.* 2, 481–485.
- 13 Bermeo, S., Vidal, C., Zhou, H., Duque, G., 2015. Lamin A/C Acts as an Essential Factor in Mesenchymal Stem Cell Differentiation Through the Regulation of the Dynamics of the Wnt/ β -Catenin Pathway. *J. Cell. Biochem.* 116, 2344–2353.
- 14 Bertrand, A.T., Chikhaoui, K., Yaou, R. Ben, Bonne, G., 2011. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1687–1692.
- 15 Bitman-Lotan, E., Orian, A., 2021. Nuclear organization and regulation of the differentiated state. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 3141–3158.
- 16 Blondel, S., Jaskowiak, A.-L., Egesipe, A.-L., Le Corf, A., Navarro, C., Cordette, V., Martinat, C., Laabi, Y., Djabali, K., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., Peschanski, M., Nissan, X., 2014. Induced Pluripotent Stem Cells Reveal Functional Differences Between Drugs Currently Investigated in Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 510–519.
- 17 Boban, M., Braun, J., Foisner, R., 2010. Lamins: “Structure goes cycling.” *Biochem. Soc. Trans.* 38, 301–306.

- 18 Boguslavsky, R.L., Stewart, C.L., Worman, H.J., 2006. Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: Implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 653–663.
- 19 Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z., 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801.
- 20 Bourgeois, B., Gilquin, B., Tellier-Lebègue, C., Östlund, C., Wu, W., Pérez, J., Hage, P. El, Lallemand, F., Worman, H.J., Zinn-Justin, S., 2013. Inhibition of TGF- β signaling at the nuclear envelope: Characterization of interactions between MAN1, Smad2 and Smad3, and PPM1A. *Sci. Signal.* 6, 1–11.
- 21 Brachner, A., Foisner, R., 2011. Evolvement of LEM proteins as chromatin tethers at the nuclear periphery. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1735–1741.
- 22 Bray, S.J., 2006. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- 23 Briand, N., Collas, P., 2020. Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol.* 21, 1–25.
- 24 Burke, B., Stewart, C.L., 2013. The nuclear lamins: Flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 13–24.
- 25 Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., Plews, J.R., Abilez, O.J., Cui, B., Gold, J.D., Wu, J.C., 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* 11, 855–860.
- 26 Cadot, B., Gache, V., Vasyutina, E., Falcone, S., Birchmeier, C., Gomes, E.R., 2012. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep.* 13, 741–749.
- 27 Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R., Clore, G.M., 2001. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: One binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J.* 20, 4399–4407.
- 28 Capanni, C., Cenni, V., Mattioli, E., Sabatelli, P., Ognibene, A., Columbaro, M., Parnaik, V.K., Wehnert, M., Maraldi, N.M., Squarzone, S., Lattanzi, G., 2003. 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. *Exp. Cell Res.* 291, 122–134.
- 29 Case, N., Rubin, J., 2010. β -catenin - A supporting role in the skeleton. *J. Cell. Biochem.* 110, 545–553.
- 30 Cattin, M.E., Muchir, A., Bonne, G., 2013. “State-of-the-heart” of cardiac laminopathies. *Curr. Opin. Cardiol.* 28, 297–304.
- 31 Chaffee, B.R., Shang, F., Chang, M.L., Clement, T.M., Eddy, E.M., Wagner, B.D., Nakahara, M., Nagata, S., Robinson, M.L., Taylor, A., 2014. Nuclear removal during terminal lens fiber cell differentiation requires CDK1 activity: Appropriating mitosis-related nuclear disassembly. *Dev.* 141, 3388–3398.
- 32 Chandar, S., Yeo, L.S., Leimena, C., Tan, J.C., Xiao, X.H., Nikolova-Krstevski, V., Yasuoka, Y., Gardiner-Garden, M., Wu, J., Kesteven, S., Karlsdotter, L., Natarajan, S., Carlton, A., Rainer, S., Feneley, M.P., Fatkin, D., 2010. Effects of mechanical stress and carvedilol in lamin A/C-deficient dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* 106, 573–582.
- 33 Chen, S.N., Lombardi, R., Karmouch, J., Tsai, J.Y., Czernuszewicz, G., Taylor, M.R.G., Mestroni, L., Coarfa, C., Gurha, P., Marian, A.J., 2019. DNA Damage Response/TP53 Pathway Is Activated and Contributes to the Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy Associated with LMNA (Lamin A/C)

Mutations. *Circ. Res.* 124, 856–873.

- 34 Chichagova, V., Sanchez-Vera, I., Armstrong, L., Steel, D., Lako, M., 2015. Generation of human induced pluripotent stem cells using rna-based sendai virus system and pluripotency validation of the resulting cell population. *Methods Mol. Biol.* 1353, 285–307.
- 35 Chin, I.L., Hool, L., Choi, Y.S., 2019. A review of in vitro platforms for understanding cardiomyocyte Mechanobiology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–10.
- 36 Cobb, A.M., Murray, T. V., Warren, D.T., Liu, Y., Shanahan, C.M., 2016. Disruption of PCNA-lamins A/C interactions by prelamin A induces DNA replication fork stalling. *Nucleus* 7, 498–511.
- 37 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., 2013. Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of *lap2 α* . *Hum. Mol. Genet.* 22, 2852–2869.
- 38 Collas, P., 2010. The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol. Biotechnol.* 45, 87–100.
- 39 Corrigan, D.P., Kuszczak, D., Rusinol, A.E., Thewke, D.P., Hrycyna, C.A., Michaelis, S., Sinensky, M.S., 2005. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem. J.* 387, 129–138.
- 40 Crasto, S., Di Pasquale, E., 2018. Induced pluripotent stem cells to study mechanisms of laminopathies: Focus on epigenetics. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 1–14.
- 41 Cremer, C., Szczurek, A., Schock, F., Gourram, A., Birk, U., 2017. Super-resolution microscopy approaches to nuclear nanostructure imaging. *Methods* 123, 11–32.
- 42 Cremer, T., Cremer, M., 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–23.
- 43 de las Heras, J.I., Meinke, P., Batrakou, D.G., Srsen, V., Zuleger, N., Kerr, A.R.W., Schirmer, E.C., 2013. Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity. *Nucl.* 4(6):460-77.
- 44 de Leeuw, R., Gruenbaum, Y., Medalia, O., 2018. Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol.* 28, 34–45.
- 45 Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., Kleckner, N., 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* (80-.). 295, 1306–1311.
- 46 Demmerle, J., Koch, A.J., Holaska, J.M., 2012. The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J. Biol. Chem.* 287, 22080–22088.
- 47 Donnalaja, F., Carnevali, F., Jacchetti, E., Raimondi, M.T., 2020. Lamin A/C Mechanotransduction in Laminopathies. *Cells.* 24;9(5):1306.
- 48 Dubinska-Magiera, M., Zaremba-Czogalla, M., Rzepecki, R., 2013. Muscle development, regeneration and laminopathies: How lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle development, regeneration and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 2713–2741.
- 49 Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.
- 50 Enyedi, B., Niethammer, P., 2017. Nuclear membrane stretch and its role in mechanotransduction. *Nucleus* 8, 156–161.
- 51 Fatkin D., MacRae C., Sasaki T., Wolff M. R., Porcu M., Frenneaux M., Atherton J., Vidaillet H. J., Spudich S., De Girolami U., Seidman J. G., Seidman C., Muntoni F., Muehle G., Johnson W., M.B., 1999. Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin a/C Gene As 1715–1724.
- 52 Favreau, C., Higuier, D., Buendia, B., Courvalin, J., 2004a. Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts 24, 1481–1492.

- 53 Favreau, C., Higuete, D., Courvalin, J.-C., Buendia, B., 2004b. Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1481–1492.
- 54 Fisher, D.Z., Chaudhary, N., Blobel, G., 1986. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6450–6454.
- 55 Frock, R.L., Kudlow, B. a, Evans, A.M., Jameson, S. a, Hauschka, S.D., Kennedy, B.K., 2006. Lamin A / C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev.* 20, 486–500.
- 56 Fujita, M., Mitsuhashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Nishino, I., Kudo, A., 2012. Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev. Biol.* 361, 79–89.
- 57 Garg, A., Cogulu, O., Ozkinay, F., Onay, H., Agarwal, A.K., 2005. A novel homozygous Ala529Val LMNA mutation in Turkish patients with mandibuloacral dysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5259–5264.
- 58 Garg, A., Vinaitheerthan, M., Weatherall, P.T., Bowcock, A.M., 2001. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin A/C gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 59–65.
- 59 Gerace, L., Tapia, O., 2018. Messages from the voices within: regulation of signaling by proteins of the nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 14–21.
- 60 Gerbino, A., Procino, G., Svelto, M., Carmosino, M., 2018. Role of Lamin A/C Gene Mutations in the signaling defects leading to cardiomyopathies. *Front. Physiol.* 9, 1–7.
- 61 González, J.M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P., Andrés, V., 2008. Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 183, 653–666.
- 62 Gonzalo, S., Kreienkamp, R., Askjaer, P., 2017. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res. Rev.* 33, 18–29.
- 63 Gruenbaum, Y., Foisner, R., 2015. Lamins: Nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 131–164.
- 64 Guelen, L., Pagie, L., Brassat, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., De Klein, A., Wessels, L., De Laat, W., Van Steensel, B., 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948–951.
- 65 Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., Burrridge, K., 2014. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* 16, 376–381.
- 66 Gusev, K., Khudiakov, A., Zaytseva, A., Perepelina, K., Makeenok, S., Kaznacheeva, E., Kostareva, A., 2020. Impact of the DSP-H1684R genetic variant on ion channels activity in iPSC-derived cardiomyocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 54, 696–706.
- 67 Håkelién, A.M., Delbarre, E., Gaustad, K.G., Buendia, B., Collas, P., 2008. Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects. *Exp. Cell Res.* 314, 1869–1880.
- 68 Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C., Shackleton, S., 2006. SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3738–3751.

- 69 Harr, J.C., Luperchio, T.R., Wong, X., Cohen, E., Wheelan, S.J., Reddy, K.L., 2015. Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *J. Cell Biol.* 208, 33–52.
- 70 Hegele, R.A., 2005. LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin. Genet.* 68, 31–34.
- 71 Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P.C.M., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S.J.T., Savarirayan, R., Van Hu, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J.M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P.J., Mortier, G.R., 2004. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat. Genet.* 36, 1213–1218.
- 72 Henrique, D., Schweisguth, F., 2019. Mechanisms of notch signaling: A simple logic deployed in time and space. *Dev.* 146.
- 73 Heo, S.J., Driscoll, T.P., Thorpe, S.D., Nerurkar, N.L., Baker, B.M., Yang, M.T., Chen, C.S., Lee, D.A., Mauck, R.L., 2016. Differentiation alters stem cell nuclear architecture, mechanics, and mechano-sensitivity. *Elife* 5, 1–21.
- 74 Herrmann, H., Aebi, U., 2004. Intermediate Filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 749–789.
- 75 Hirano, Y., Hizume, K., Kimura, H., Takeyasu, K., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., 2012. Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *J. Biol. Chem.* 287, 42654–42663.
- 76 Hori, K., Sen, A., Artavanis-Tsakonas, S., 2013. Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 2135–2140.
- 77 Ignatieva, E. V., Ivanova, O.A., Komarova, M.Y., Khromova, N. V., Polev, D.E., Kostareva, A.A., Sergushichev, A., Dmitrieva, R.I., 2020. Lmna mutations g232e and r482l cause dysregulation of skeletal muscle differentiation, bioenergetics, and metabolic gene expression profile. *Genes (Basel)*. 11, 1–20.
- 78 Ikegami, K., Secchia, S., Almakki, O., Lieb, J.D., Moskowitz, I.P., 2020. Phosphorylated Lamin A/C in the Nuclear Interior Binds Active Enhancers Associated with Abnormal Transcription in Progeria. *Dev. Cell* 52, 699-713.e11.
- 79 Isermann, P., Lammerding, J., 2013. Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Curr. Biol.* 23, R1113–R1121.
- 80 Israeli-Rosenberg, S., Manso, A.M., Okada, H., Ross, R.S., 2014. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ. Res.* 114, 572–586.
- 81 Karoutas, A., Akhtar, A., 2021. Functional mechanisms and abnormalities of the nuclear lamina. *Nat. Cell Biol.* 23, 116–126.
- 82 Kennedy, B.K., Pennypacker, J.K., 2014. RB and lamins in cell cycle regulation and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 773, 127–142.
- 83 Khudiakov, A., Zaytseva, A., Perepelina, K., Smolina, N., Pervunina, T., Vasichkina, E., Karpushev, A., Tomilin, A., Malashicheva, A., Kostareva, A., 2020. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling in iPSC-derived cardiomyocytes generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic variants in plakophilin 2 gene. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866, 165915.
- 84 Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., Gygi, S.P., 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* 44, 325–340.

- 85 Kochin, V., Shimi, T., Torvaldson, E., Adam, S.A., Goldman, A., Pack, C.G., Melo-Cardenas, J., Imanishi, S.Y., Goldman, R.D., Eriksson, J.E., 2014. Interphase phosphorylation of lamin A. *J. Cell Sci.* 127, 2683–2696.
- 86 Kondé, E., Bourgeois, B., Tellier-Lebegue, C., Wu, W., Pérez, J., Caputo, S., Attanda, W., Gasparini, S., Charbonnier, J.B., Gilquin, B., Worman, H.J., Zinn-Justin, S., 2010. Structural analysis of the Smad2-MAN1 interaction that regulates transforming growth factor- β signaling at the inner nuclear membrane. *Biochemistry* 49, 8020–8032.
- 87 Kostina, A., Shishkova, A., Ignatieva, E., Irtyuga, O., Bogdanova, M., Levchuk, K., Golovkin, A., Zhiduleva, E., Uspenskiy, V., Moiseeva, O., Faggian, G., Vaage, J., Kostareva, A., Rutkovskiy, A., Malashicheva, A., 2018. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 114, 211–219.
- 88 Lee, B., Lee, T.H., Shim, J., 2017. Emerin suppresses Notch signaling by restricting the Notch intracellular domain to the nuclear membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 303–313.
- 89 Lee, Y.L., Burke, B., 2018. LINC complexes and nuclear positioning. *Semin. Cell Dev. Biol.* 82, 67–76.
- 90 Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., Palecek, S.P., 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* 8, 162–175.
- 91 Lieberman-aiden, E., Berkum, N.L. Van, Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., 2009. of the Human Genome 33292, 289–294.
- 92 Liu, S.Y., Ikegami, K., 2020. Nuclear lamin phosphorylation: an emerging role in gene regulation and pathogenesis of laminopathies. *Nucleus* 11, 299–314.
- 93 Lund, E., Collas, P., 2013. Nuclear lamins: Making contacts with promoters. *Nucl.* 4(6):424-30.
- 94 Lund, E., Oldenburg, A.R., Collas, P., 2014. Enriched domain detector: A program for detection of wide genomic enrichment domains robust against local variations. *Nucleic Acids Res.* 42(11):e92.
- 95 Lund, E., Oldenburg, A.R., Delbarre, E., Freberg, C.T., Duband-Goulet, I., Eskeland, R., Buendia, B., Collas, P., 2013. Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes. *Genome Res.* 23, 1580–1589.
- 96 Lund, E.G., Duband-Goulet, I., Oldenburg, A., Buendia, B., Collas, P., 2015. Distinct features of lamin A-interacting chromatin domains mapped by Chip-sequencing from sonicated or micrococcal nuclease-digested chromatin. *Nucleus* 6, 30–39.
- 97 Makarov, A.A., Zou, J., Houston, D.R., Spanos, C., Solovyova, A.S., Cardenal-Peralta, C., Rappsilber, J., Schirmer, E.C., 2019. Lamin A molecular compression and sliding as mechanisms behind nucleoskeleton elasticity. *Nat. Commun.* 10, 1–17.
- 98 Malashicheva, A., Bogdanova, M., Zibirnyk, A., Smolina, N., Ignatieva, E., Freilikhman, O., Fedorov, A., Dmitrieva, R., Sjöberg, G., Sejersen, T., Kostareva, A., 2015. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner. *Mol. Genet. Metab.* 115, 118–127.
- 99 Malashicheva, A., Kanzler, B., Tolkunova, E., Trono, D., Tomilin, A., 2007. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis* 45, 456–9.
- 100 Malashicheva, A., Perepelina, K., 2021. Diversity of Nuclear Lamin A/C Action as a Key to Tissue-Specific Regulation of Cellular Identity in Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–18.
- 101 Maniotis, A.J., Chen, C.S., Ingber, D.E., 1997. Demonstration of mechanical connections between

- integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure (cell mechanics cell engineering integrity extracellular matrix mechanotransduction). *Cell Biol.* 94, 849–854.
- 102 Maraldi, N.M., Capanni, C., Cenni, V., Fini, M., Lattanzi, G., 2011. Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* 112, 979–992.
- 103 Maraldi, N.M., Lattanzi, G., Cenni, V., Bavelloni, A., Marmiroli, S., Manzoli, F.A., 2010. Laminopathies and A-type lamin-associated signalling pathways. *Adv. Enzyme Regul.* 50, 248–261.
- 104 Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R., Gruenbaum, Y., 2007. Barrier-to-autointegration factor - a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol.* 17, 202–208.
- 105 Mariappan, I., Gurung, R., Thanumalayan, S., Parnaik, V.K., 2007. Identification of cyclin D3 as a new interaction partner of lamin A/C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 981–985.
- 106 Martino, F., Perestrelo, A.R., Vinarský, V., Pagliari, S., Forte, G., 2018. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front. Physiol.* 9, 1–21.
- 107 Mattout, A., Goldberg, M., Tzur, Y., Margalit, A., Gruenbaum, Y., 2007. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J. Cell Sci.* 120, 77–85.
- 108 Melcer, S., Meshorer, E., 2010. The silence of the LADs: Dynamic genome-lamina interactions during ESC differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 495–497.
- 109 Meshorer, E., Gruenbaum, Y., 2008. Gone with the Wnt/Notch: Stem cells in laminopathies, progeria, and aging. *J. Cell Biol.* 181, 9–13.
- 110 Millay, D.P., Sutherland, L.B., Bassel-duby, R., Olson, E.N., 2014. Myomaker is essential for muscle regeneration Myomaker is essential for muscle regeneration 1641–1646.
- 111 Mirza, A.N., Gonzalez, F., Ha, S.K., Oro, A.E., 2021. The Sky's the LEMit: New insights into nuclear structure regulation of transcription factor activity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 68, 173–180.
- 112 Muchir, A., Bonne, G., Van Der Kool, A.J., Van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., De Visser, M., Schwartz, K., 2000. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 9, 1453–1459.
- 113 Muchir, A., Pavlidis, P., Bonne, G., Hayashi, Y.K., Worman, H.J., 2007. Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: Similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery - Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1884–1895.
- 114 Muchir, A., Worman, H.J., 2007. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7, 78–83.
- 115 Naetar, N., Ferraioli, S., Foisner, R., 2017. Lamins in the nuclear interior - Life outside the lamina. *J. Cell Sci.* 130, 2087–2096.
- 116 Navarro, C.L., Cau, P., Lévy, N., 2006. Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15, 151–161.
- 117 Neganova, I., Chichagova, V., Armstrong, L., Lako, M., 2017. A critical role for p38MAPK signalling pathway during reprogramming of human fibroblasts to iPSCs. *Sci. Rep.* 7, 1–13.
- 118 Neganova, I., Shmeleva, E., Munkley, J., Chichagova, V., Anyfantis, G., Anderson, R., Passos, J., Elliott, D.J., Armstrong, L., Lako, M., 2016. JNK/SAPK Signaling Is Essential for Efficient Reprogramming of Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 34, 1198–1212.
- 119 Oldenburg, A.R., Collas, P., 2016. Mapping nuclear lamin-genome interactions by chromatin immunoprecipitation of nuclear lamins. *Methods Mol. Biol.* 1411, 315–324.
- 120 Osmanagic-Myers, S., Dechat, T., Foisner, R., 2015. Lamins at the crossroads of mechanosignaling.

Genes Dev. 29, 225–237.

- 121 Osmanagic-Myers, S., Foisner, R., 2019. The structural and gene expression hypotheses in laminopathic diseases - Not so different after all. *Mol. Biol. Cell* 30, 1786–1790.
- 122 Ou, H.D., Phan, S., Deerinck, T.J., Thor, A., Ellisman, M.H., O’Shea, C.C., 2017. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* (80-.). 357.
- 123 Park, Y.E., Hayashi, Y.K., Goto, K., Komaki, H., Hayashi, Y., Inuzuka, T., Noguchi, S., Nonaka, I., Nishino, I., 2009. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul. Disord.* 19, 29–36.
- 124 Pekovic, V., Harborth, J., Broers, J.L. V, Ramaekers, F.C.S., Van Engelen, B., Lammens, M., Von Zglinicki, T., Foisner, R., Hutchison, C., Markiewicz, E., 2007. Nucleoplasmic LAP2??-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 176, 163–172.
- 125 Pereira, S., Bourgeois, P., Navarro, C., Esteves-Vieira, V., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., Lévy, N., 2008. HGPS and related premature aging disorders: From genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech. Ageing Dev.* 129, 449–459.
- 126 Perepelina, K., Dmitrieva, R., Ignatieva, E., Borodkina, A., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2018. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling. *Biochem. Cell Biol.* 96, 342–348.
- 127 Perepelina, K., Klauzen, P., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2019. Tissue-Specific Influence of Lamin A Mutations on Notch Signaling and Osteogenic Phenotype of Primary Human Mesenchymal Cells. *Cells* 8, 266.
- 128 Perepelina, K., Kostina, A., Klauzen, P., Khudiakov, A., Rabino, M., Crasto, S., Zlotina, A., Fomicheva, Y., Sergushichev, A., Oganessian, M., Dmitriev, A., Kostareva, A., Di Pasquale, E., Malashicheva, A., 2020. Generation of two iPSC lines (FAMRCi007-A and FAMRCi007-B) from patient with Emery–Dreifuss muscular dystrophy and heart rhythm abnormalities carrying genetic variant LMNA p.Arg249Gln. *Stem Cell Res.* 47, 101895.
- 129 Perepelina, K., Zaytseva, A., Khudiakov, A., Neganova, I., Vasichkina, E., Malashicheva, A., Kostareva, A., 2022. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc. Med.* 932956.
- 130 Piekarowicz, K., Machowska, M., Dratkiewicz, E., Lorek, D., Madej-Pilarczyk, A., Rzepecki, R., 2017. The effect of the lamin A and its mutants on nuclear structure, cell proliferation, protein stability, and mobility in embryonic cells. *Chromosoma* 126, 501–517.
- 131 Poh, Y.C., Shevtsov, S.P., Chowdhury, F., Wu, D.C., Na, S., Dundr, M., Wang, N., 2012. Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nat. Commun.* 29;3:866.
- 132 Poleshko, A., Shah, P.P., Gupta, M., Babu, A., Morley, M.P., Manderfield, L.J., Ifkovits, J.L., Calderon, D., Aghajanian, H., Sierra-Pagán, J.E., Sun, Z., Wang, Q., Li, L., Dubois, N.C., Morrissey, E.E., Lazar, M.A., Smith, C.L., Epstein, J.A., Jain, R., 2017. Genome-Nuclear Lamina Interactions Regulate Cardiac Stem Cell Lineage Restriction. *Cell* 171, 573-587.e14.
- 133 Poleshko, A., Smith, C.L., Nguyen, S.C., Sivaramakrishnan, P., Wong, K.G., Murray, J.I., Lakadamyali, M., Joyce, E.F., Jain, R., Epstein, J.A., 2019. H3k9me2 orchestrates inheritance of spatial positioning of peripheral heterochromatin through mitosis. *Elife* 8, 1–24.
- 134 Prokocimer, M., Davidovich, M., Nissim-Rafinia, M., Wiesel-Motiuk, N., Bar, D.Z., Barkan, R., Meshorer, E., Gruenbaum, Y., 2009. Nuclear lamins: Key regulators of nuclear structure and activities.

- J. Cell. Mol. Med. 13, 1059–1085.
- 135 Rankin, J., Ellard, S., 2006. The laminopathies: A clinical review. *Clin. Genet.* 70, 261–274.
 - 136 Ricci, M.A., Cosma, M.P., Lakadamyali, M., 2017. Super resolution imaging of chromatin in pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 46, 186–193.
 - 137 Robson, M.I., de las Heras, J.I., Czapiewski, R., Lê Thành, P., Booth, D.G., Kelly, D.A., Webb, S., Kerr, A.R.W., Schirmer, E.C., 2016. Tissue-Specific Gene Repositioning by Muscle Nuclear Membrane Proteins Enhances Repression of Critical Developmental Genes during Myogenesis. *Mol. Cell* 62, 834–847.
 - 138 Rønningen, T., Shah, A., Oldenburg, A.R., Vekterud, K., Delbarre, E., Moskaug, J.O., Collas, P., 2015. Prepatterning of differentiation-driven nuclear lamin A/C-associated chromatin domains by GlcNAcylated histone H2B. *Genome Res.* 25, 1825–1835.
 - 139 Salvarani, N., Crasto, S., Miragoli, M., Bertero, A., Paulis, M., Kunderfranco, P., Serio, S., Forni, A., Lucarelli, C., Dal Ferro, M., Larcher, V., Sinagra, G., Vezzoni, P., Murry, C.E., Faggian, G., Condorelli, G., Di Pasquale, E., 2019. The K219T-Lamin mutation induces conduction defects through epigenetic inhibition of SCN5A in human cardiac laminopathy. *Nat. Commun.* 10, 1–16.
 - 140 Sato, P.Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patiño, G.A., Taffet, S.M., Isom, L.L., Delmar, M., 2009. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* 105, 523–526.
 - 141 Scaffidi, P., Misteli, T., 2008. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* 10, 452–459.
 - 142 Scharner, J., Gnocchi, V.F., Ellis, J.A., Zammit, P.S., 2010. Genotype-phenotype correlations in laminopathies: How does fate translate? *Biochem. Soc. Trans.* 38, 257–262.
 - 143 Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K., Just, U., 2011. The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 572–581.
 - 144 Shah, P.P., Lv, W., Rhoades, J.H., Poleshko, A., Abbey, D., Caporizzo, M.A., Linares-Saldana, R., Heffler, J.G., Sayed, N., Thomas, D., Wang, Q., Stanton, L.J., Bedi, K., Morley, M.P., Cappola, T.P., Owens, A.T., Margulies, K.B., Frank, D.B., Wu, J.C., Rader, D.J., Yang, W., Prosser, B.L., Musunuru, K., Jain, R., 2021. Pathogenic LMNA variants disrupt cardiac lamina-chromatin interactions and de-repress alternative fate genes. *Cell Stem Cell* 28, 938-954.e9.
 - 145 Shevelyov, Y.Y., Ulianov, S. V., 2019. The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. *Cells* 8, 136.
 - 146 Shumaker, D.K., Solimando, L., Sengupta, K., Shimi, T., Adam, S.A., Grunwald, A., Strelkov, S. V., Aebi, U., Cardoso, M.C., Goldman, R.D., 2008. The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: Its role in DNA replication. *J. Cell Biol.* 181, 269–280.
 - 147 Shy, D., Gillet, L., Abriel, H., 2013. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 886–894.
 - 148 Smits, A.M., van Vliet, P., Metz, C.H., Korfage, T., Sluijter, J.P.G., Doevendans, P.A., Goumans, M.J., 2009. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: An in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat. Protoc.* 4, 232–243.
 - 149 Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajeroski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.W., Tewari, M., Rehfeldt, F., Speicher, D.W., Discher, D.E., 2013. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* (80-.). 341.
 - 150 Tilgner, K., Wojciechowicz, K., Jahoda, C., Hutchison, C., Markiewicz, E., 2009. Dynamic complexes of A-type lamins and emerin influence adipogenic capacity of the cell via nucleocytoplasmic

- distribution of β -catenin. *J. Cell Sci.* 122, 401–413.
- 151 Tong, J., Li, W., Vidal, C., Yeo, L.S., Fatkin, D., Duque, G., 2011. Lamin A/C deficiency is associated with fat infiltration of muscle and bone. *Mech. Ageing Dev.* 132, 552–559.
 - 152 Tsukune, N., Naito, M., Kubota, T., Ozawa, Y., Nagao, M., Ohashi, A., Sato, S., Takahashi, T., 2017. Lamin A overexpression promotes osteoblast differentiation and calcification in the MC3T3-E1 preosteoblastic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 664–670.
 - 153 Ullah, I., Subbarao, R.B., Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 35.
 - 154 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., 2014. The p.R482W substitution in a-type lamins deregulates SREBP1 activity in dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2096–2109.
 - 155 Van Berlo, J.H., Voncken, J.W., Kubben, N., Broers, J.L.V., Duisters, R., van Leeuwen, R.E.W., Crijns, H.J.G.M., Ramaekers, F.C.S., Hutchison, C.J., Pinto, Y.M., 2005. A-type lamins are essential for TGF- β 1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2839–2849.
 - 156 Van Steensel, B., Henikoff, S., 2000. Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered Dam methyltransferase. *Nat. Biotechnol.* 18, 424–428.
 - 157 Wang, T., Zhang, X., Bikle, D.D., 2017. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J. Cell. Physiol.* 232, 913–921.
 - 158 Wong, X., Stewart, C.L., 2020. The Laminopathies and the Insights They Provide into the Structural and Functional Organization of the Nucleus. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 21, 263–288.
 - 159 Worman, H.J., 2018. Cell signaling abnormalities in cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutations. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 37–42.
 - 160 Worman, H.J., 2012. Nuclear lamins and laminopathies. *J. Pathol.* 226, 316–325.
 - 161 Worman, H.J., Ostlund, C., Wang, Y., 2010. Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
 - 162 Wu, D., Flannery, A.R., Cai, H., Ko, E., Cao, K., 2014. Nuclear localization signal deletion mutants of lamin A and progerin reveal insights into lamin A processing and emerin targeting. *Nucl. (United States)* 5, 37–41.
 - 163 Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. a, 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
 - 164 Zanotti, S., Canalis, E., 2016. Notch signaling and the skeleton. *Endocr. Rev.* 37, 223–253.
 - 165 Zaremba-Czogalla, M., Dubińska-Magiera, M., Rzepecki, R., 2011. Laminopathies: The molecular background of the disease and the prospects for its treatment, *Cellular and Molecular Biology Letters*.
 - 166 Zhang, B., Yang, Y., Keyimu, R., Hao, J., Zhao, Z., Ye, R., 2019. The role of lamin A/C in mesenchymal stem cell differentiation. *J. Physiol. Biochem.* 75, 11–18.
 - 167 Zhang, H., Kieckhafer, J.E., Cao, K., 2013. Mouse models of laminopathies. *Aging Cell* 12, 2–10.
 - 168 Zhang, Y.Q., Sarge, K.D., 2008. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J. Cell Biol.* 182, 35–39.
 - 169 Zuleger, N., Robson, M.I., Schirmer, E.C., 2011. The nuclear envelope as a chromatin organizer. *Nucleus.* 2, 5, 339-49.

SAINT-PETERSBURG STATE UNIVERSITY

Printed as manuscript

Perepelina Kseniia Igorevna

Impact of the tissue-specific mutations in the *LMNA* gene on cell differentiation

1.5.22. Cell biology

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences

Translation from Russian

Supervisor:
Doctor of Biological Sciences,
Malashicheva Anna Borisovna

Saint-Petersburg – 2022

CONTENTS

Introduction	
1. LITERATURE REVIEW	102
1.1 Nuclear lamins	102
1.2 Organization, maturation and assembly of lamin A/C	102
1.3 Lamin A/C-binding proteins	105
1.4 Lamin A/C participation in tissue-specific regulation of cell differentiation	106
1.4.1 Lamin A/C role in mechanosignaling defining cell differentiation	106
1.4.2 Lamin A/C role in regulation chromatin organization and gene expression	109
1.4.3 Lamin A/C cooperation with signaling pathways during cell differentiation	112
1.5 Laminopathies	114
2. MATERIALS AND METHODS	118
2.1 Cell cultures.....	118
2.1.1 Isolation and cultivation of mouse satellite cells.....	118
2.1.2 Mouse myoblasts C2C12	118
2.1.3 Interstitial cells of the human aortic valve (IC).....	119
2.1.4 Human aortic smooth muscle cells (SMC)	119
2.1.5 Human umbilical vein endothelial cells (EC)	119
2.1.6 Human cardiac mesenchymal cells (CMC).....	120
2.1.7 Induced pluripotent stem cells (iPSC)	121
2.2 Plasmids	123
2.3 Production of lentiviruses	123
2.4 Immunofluorescence staining.....	123
2.5 Gene expression analysis	125
2.6 qPCR data analysis	128
2.7 RT-PCR	128
2.8 Alkaline phosphatase staining	129
2.9 Promoter activity assay	129
2.10 Sodium current recording	129
2.11 Data analysis	130
3. RESULTS AND DISCUSSIONS.....	131
3.1 Investigation of the <i>LMNA</i> mutations' effect on muscle differentiation	131
3.1.1 Effect of the G232E and R571S mutations in the <i>LMNA</i> gene on myotube formation..	131
3.1.2 Impact of the G232E and R571L <i>LMNA</i> mutations on the expression of the myogenic markers	134
3.1.3 Discussion of the results obtained in the study of the <i>LMNA</i> mutations effect on the C2C12	

cells and mouse satellite cell muscle differentiation	135
3.2 Investigation of the <i>LMNA</i> mutations' impact on adipogenic differentiation	137
3.2.1 Evaluation of cell transduction efficiency and nuclear morphology	137
3.2.2 Evaluation of the <i>LMNA</i> R482L impact on the Notch pathway activity in the undifferentiated cells	138
3.2.3 Evaluation of the <i>LMNA</i> R482L effect on adipogenic differentiation under conditions of Notch activation	138
3.2.4 Evaluation of the <i>LMNA</i> R482L effect on Notch signaling activity in differentiated CMCs.....	140
3.2.5 Discussion of the results obtained from the study of the <i>LMNA</i> R482L effect on the adipogenic differentiation and the functioning of the Notch signaling pathway.....	141
3.3 Study of the effect of tissue-specific mutations in the <i>LMNA</i> gene on the process of osteogenic differentiation of human mesenchymal cells	142
3.3.1 Evaluation of cell transduction efficiency and nuclear morphology	142
3.3.2 Evaluation of the <i>LMNA</i> R527C and <i>LMNA</i> R471C impact on the expression of osteogenic markers in human mesenchymal cells (EC, CMC, SMC, and IC).....	143
3.3.3 Evaluation of the <i>LMNA</i> R527C and <i>LMNA</i> R471C impact on the expression of Notch-related genes in human mesenchymal cells	146
3.3.4 Evaluation of the <i>LMNA</i> R527C effect on the CMC and IC osteogenic differentiation in the presence of Notch activation.....	149
3.3.5 Analysis of osteogenic markers and Notch target genes expression in different lines of undifferentiated mesenchymal cells	151
3.3.6 Discussion of the results obtained in the study of the <i>LMNA</i> R527C and <i>LMNA</i> R471C effect on the process of osteogenic differentiation in cells of mesenchymal origin	151
3.4 Study of the patient-specific <i>LMNA</i> mutation's effect on the cardiogenic differentiation of induced human pluripotent stem cells	153
3.4.1 Generation and characterization of the iPSC line carrying R249Q <i>LMNA</i> mutation.....	153
3.4.2 Generation of the iPSC-based model of healthy CMs and <i>LMNA</i> R249Q CMs.....	155
3.4.3 Evaluation of the <i>LMNA</i> R249Q effect on the expression profile of iPSC-CMs at the late stage of differentiation.....	157
3.4.4 Electrophysiological characterization of iPSC-CMs carrying <i>LMNA</i> R249Q mutation	158
3.4.5 Discussion of the results obtained in the study of the <i>LMNA</i> R249Q mutation effect on the process of cardiogenic differentiation of the iPSC.....	160
CONCLUSION.....	163
Abbreviations.....	167
References	168

INTRODUCTION

The relevance of the research

A-type lamins are the main structural proteins of the cell's nuclear membrane and belong to the class of type V intermediate filaments. Lamin filaments are an ordered structure, the nuclear lamina, that provides strength to the cell's nuclear membrane (Naetar et al., 2017). Initially, A-type nuclear lamins were thought to play an exclusively structural role, maintaining the shape and rigidity of the nucleus. However, A-type lamins are now known to be important regulators of gene expression and key mediators of cell fate. Lamin A/C has been shown to be involved in chromatin organization, DNA replication, regulation of gene transcription, cell differentiation, etc. A-type lamins perform most of these functions through interactions with inner nuclear membrane proteins, transcription factors, and DNA. A-type lamins are believed to regulate the activity of important signaling pathways in cells (such as Rb/E2F, Wnt/ β -catenin, TGF β , Notch) through their direct or indirect interaction with other proteins.

Laminopathies are a broad group of diseases associated with mutations in the lamin A/C (*LMNA*) gene. The clinical phenotypes of laminopathies are extremely diverse and include cardiomyopathies, myopathies and myodystrophies, arrhythmias, lesions of the central and peripheral nervous system, and progeria. Despite the great relevance of these studies due to the severity of the course and unfavorable prognosis of most laminopathies, the mechanisms by which nuclear lamins cause the development of so different, at first glance, diseases affecting different systems and organs, remain undiscovered. Understanding the mechanisms of functioning of lamins, as well as their role in the development of pathologies with mutations in the *LMNA* gene, seems to be extremely relevant due to the rapid growth of descriptions of new forms of lamin-associated diseases (Burke and Stewart 2013; Dubinska-Magiera et al. 2013; de Las Heras et al. 2014).

Given the expression of A-type lamins in all types of differentiated cells, selective tissue damage seems unclear. The most well-known modification of lamin A/C is progerin, which causes a serious developmental disorder - premature aging syndrome or progeria. This known disease is extremely rare. At the same time, *LMNA* point mutations leading to tissue damage are more common. The molecular mechanisms by which *LMNA* mutations impair stem cell differentiation have not yet been described in detail. It is known that lamins can interact with components of various signaling pathways in the cell. One of the main signaling pathways responsible for intercellular signaling and stem cell differentiation is the Notch signaling pathway (Andersson et al., 2011). The role of the Notch signaling pathway itself in the process of differentiation of different cell types remains insufficiently studied, which is a separate, also relevant topic for research. In a model of progeria, a mutant form of *LMNA* encoding a truncated form of lamin A, progerin, has been shown to affect the functioning of the Notch signaling pathway (Meshorer and Gruenbaum, 2008; Scaffidi and Misteli, 2008).

Recently, research has mainly focused on the study of the molecular mechanisms of the development of laminopathies. Proposed pathology mechanisms include disruption of chromatin organization, intracellular signaling, and epigenetic changes. Probably, all these changes lead to dysregulation of genes responsible for cell differentiation. Lamin-chromatin interaction sites (lamin-associated domains - LADs) are known to be involved in the regulation of gene expression. LADs contain many differentiation-related genes that are either active or inactive depending on their association with chromatin. Active gene expression is associated with the release of LAD from the nuclear lamina. In contrast, expression inactivation is the result of LAD attachment to the lamina.

Difficulties in studying the role of lamin A/C in cell differentiation are associated, in particular, with the lack of a unified experimental model. Nowadays, the use of progenitor cells of various origins to recreate the model of laminopathies is relevant. Thus, in our study, we use a spectrum of different cells capable of differentiating in the myogenic, adipogenic, and osteogenic directions. To study the effect of *LMNA* mutations on cell differentiation, we use the technique of introducing a mutated *LMNA* gene on a lentivirus carrier. Modification of the cell genome by introducing exogenous forms of lamin A/C with a mutation makes it possible to study the changes in cells that occur due to mutations, which ultimately leads to the development of laminopathies. Currently, it is especially important to study the mechanisms of development of laminopathies using the model of induced pluripotent stem cells (iPSCs) obtained from patients carrying mutations in the *LMNA* gene. Differentiation of iPSCs, in particular in the cardiomyocyte direction, makes it possible to recreate the picture of the disease on cells that carry the patient's genotype.

Thus, the discovery of the mechanisms of the influence of type A nuclear lamins on cell differentiation is an important direction both from the point of view of fundamental biology and from the point of view of practical application. The use of several cellular models used to reconstruct the disease pattern caused by mutations in the *LMNA* gene will allow us to get closer to the mechanism of the development of tissue-specific disorders.

Also, the relevance of research in this area is dictated by the potential for the development of therapeutic approaches based on the elucidation of the main mechanisms of the pathogenesis of laminopathies.

Theoretical and practical significance of the work

The obtained data make a significant contribution to the fundamental understanding of the role of A-type lamins in the process of cell differentiation, as well as the molecular mechanisms underlying the development of laminopathies. The results of the study demonstrate an individual cellular response under the action of various mutations in the *LMNA* gene on the differentiation of various cells of mesenchymal origin, thereby confirming the tissue-specific nature of the development of laminopathies. The proposed study is of undoubted interest and importance for Russian science and medicine. Further research is needed

to better understand the subtle molecular basis of disease development. We suggest that our work may be an impetus for future strategies in cell therapy concerning genetically determined diseases - laminopathies.

The aim and objectives of the study

The **aim** of this work is to study the impact of mutations in the *LMNA* gene on the processes of cell differentiation.

Objectives:

1. To study the effect of tissue-specific mutations in the *LMNA* gene on myogenic differentiation of C2C12 mouse myoblasts and mouse primary satellite cells.
2. To study the effect of tissue-specific mutations in the *LMNA* gene on the adipogenic differentiation of human cardiac mesenchymal cells.
3. To study the effect of tissue-specific mutations in the *LMNA* gene on osteogenic differentiation of several cell types of mesenchymal origin.
4. To study the interaction of lamin A/C with the Notch signaling pathway.
5. To study the effect of a tissue-specific mutation in the *LMNA* gene on the change in the expression profile of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells of a patient with a *LMNA* mutation compared to cardiomyocytes from healthy donors.
6. To study the effect of a tissue-specific mutation in the *LMNA* gene on the change in the electrophysiological properties of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells of a patient with a *LMNA* mutation compared to cardiomyocytes from healthy donors.

The scientific novelty of work

The use of several types of cells of mesenchymal origin, as well as induced pluripotent stem cells (iPSCs) as cell models in this work, makes it possible to get closer to deciphering the tissue-specific mechanism of the laminopathies development. A wide range of mutations in the *LMNA* gene, in turn, is a relevant tool for recreating the picture of the disease. We have shown that the effect of a particular *LMNA* mutation may depend on the activity of the Notch pathway, which also reflects and confirms the fact of interaction between Notch and A-type lamins. Interesting data were obtained on the properties of cardiomyocytes obtained from iPSCs of a patient with the *LMNA* R249Q mutation at the electrophysiological and expression levels: the mutation leads to an increase in the cardiogenic potential of iPSCs, while at the same time, CMCs with this mutation are characterized by a slowdown in the kinetics of

the voltage-dependent cardiac sodium channel Nav 1.5.

Principal findings to be considered

1. There is a violation of the process of muscle differentiation of mouse primary satellite cells and C2C12 cells under the action of *LMNA* G232E and *LMNA* R571S mutations.
2. Suppression of the process of adipogenic differentiation is observed together with a decrease in the activity of the Notch signaling pathway under the action of the *LMNA* R482L mutation.
3. An opposite effect of the *LMNA* R527C mutation on Notch signaling activity and osteogenic differentiation in human heart mesenchymal cells and human aortic valve interstitial cells is observed.
4. The effect of A-type lamins on cell differentiation is carried out in cooperation with the Notch signaling pathway, which is tissue-specific and may depend on the specific direction of differentiation
5. Cardiomyocytes obtained during cardiogenic differentiation of induced pluripotent stem cells with *LMNA* R249Q mutation are characterized by an altered expression profile.
6. Cardiomyocytes obtained during cardiogenic differentiation of induced pluripotent stem cells with the *LMNA* R249Q mutation are characterized by altered electrophysiological properties compared to cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells from a healthy donor.

Publications and approbation of work

Based on the materials of the dissertation, 9 papers were published: 6 scientific articles in journals indexed by WoS/Scopus systems, and 3 theses in the materials of international conferences.

The main provisions and scientific results of the dissertation were presented in reports at scientific conferences: European Society of Cardiology (ESC) Congress 2017 (Barcelona, Spain, 26-30 August 2017); 5th Frontiers in CardioVascular Biology 2018 (Vienna, Austria, April 20-22, 2018); XXVI Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus 2019 (Dijon, France, May 20-23, 2019); The Notch Meeting XI (Athens, Greece, 6–10 October 2019); I All-Russian Congress with international participation "Physiology and tissue engineering of the heart and blood vessels: from cell biology to prosthetics." (Kemerovo, Russia, November 3-7, 2019).

List of articles published in journals indexed by WoS and/or Scopus:

1. **Perepelina, K.I.**, Smolina, N.A., Zabinik, A.S., Dmitrieva, R.I., Malashicheva, A.B., Kostareva,

- A.A. 2017. Effect of mutations in the LMNA gene on myogenic differentiation of primary satellite cells and C2C12 cells. *Cytology* 59(2): 117–124.
2. **Perepelina, K.**, Dmitrieva, R., Ignatieva, E., Borodkina, A., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2018. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling. *Biochem. Cell Biol.* 96, 342–348.
 3. **Perepelina, K.**, Klauzen, P., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2019. Tissue-Specific Influence of Lamin A Mutations on Notch Signaling and Osteogenic Phenotype of Primary Human Mesenchymal Cells. *Cells* 8, 266.
 4. **Perepelina, K.**, Kostina, A., Klauzen, P., Khudiakov, A., Rabino, M., Crasto, S., Zlotina, A., Fomicheva, Y., Sergushichev, A., Oganessian, M., Dmitriev, A., Kostareva, A., Di Pasquale, E., Malashicheva, A., 2020. Generation of two iPSC lines (FAMRCi007-A and FAMRCi007-B) from patient with Emery–Dreifuss muscular dystrophy and heart rhythm abnormalities carrying genetic variant LMNA p.Arg249Gln. *Stem Cell Res.* 47, 101895.
 5. Malashicheva, A., **Perepelina, K.**, 2021. Diversity of Nuclear Lamin A/C Action as a Key to Tissue-Specific Regulation of Cellular Identity in Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–18.
 6. **Perepelina, K.**, Zaytseva, A., Khudiakov, A., Neganova, I., Vasichkina, E., Malashicheva, A., Kostareva, A., 2022. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery–Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc. Med.* 932956.

Theses:

7. **Perepelina, K.**, Kostareva, A., Malashicheva, A. 2017. Lamin A/C mutations influence differentiation of cardiac stem cells through interacting with Notch and Wnt pathways. *European Heart Journal.* 38, Issue suppl_1, ehx501.40.
8. **Perepelina, K.**, Dmitrieva, R., Kostareva, A., Malashicheva, A. 2018. Lamin A/C mutation associated with mandibuloacral dysplasia influences osteogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling. *Cardiovascular Research*, volume 114, issue suppl_1, 1 pages S5.
9. **Perepelina, K.**, Klauzen, P., Kostareva, A., Malashicheva, A. 2019. Lamin A mutations influence Notch signaling and the osteogenic phenotype of human primary mesenchymal cells in a tissue-specific manner. *Biopolymers and cell*, volume 35 (3) p. 198.

1. LITERATURE REVIEW

1.1 Nuclear lamins

Nuclear lamins in metazoan cells are members of the type V intermediate filament (IF) family. There are two groups of lamins, the A type and the B type, which, in association with inner nuclear membrane proteins, form a stiff meshwork under the inner nuclear membrane termed the nuclear lamina (Figure 1).

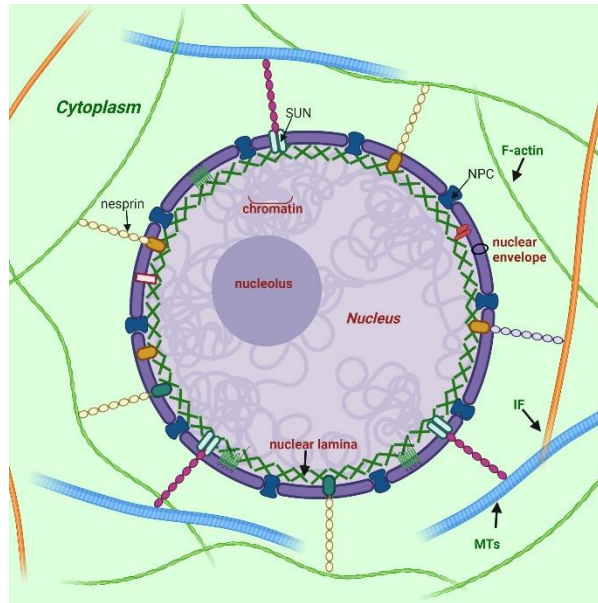


Figure 1. Spatial position of the nuclear lamina and its interaction with other cell structures (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Lamins A and B-type are encoded by different genes. The *LMNA* gene is located on chromosome 1 and encodes A-type lamins. As a result of alternative splicing of *LMNA* gene transcript, several isoforms such as A, C and minor isoforms A Δ 10 and C2 are generated. B-type lamin includes isoforms B1, B2 and B3. Lamin B1 is encoded by the *LMNB1* gene located on chromosome 5, while lamins B2 and B3 are encoded by the *LMNB2* gene located on chromosome 19. Lamins A and B-type differ in their expression pattern, post-translational modifications, and cellular localization. While B-type lamins are expressed overall in all cells, A-type lamins are only expressed in differentiated cells, which apparently determines the specific functions of this type of lamin in the cell. Moreover, the expression level of lamin A/C varies in different tissues (Gruenbaum and Foisner, 2015).

1.2 Organization, maturation and assembly of lamin a/c

Along with all IFs, lamin filaments contain three structural domains: a central α -helical rod domain, a short globular amino-terminal “head” domain and a long carboxyterminal “tail” domain. The rod domain of lamins includes three helical segments (1A, 1B, and 2), connected by short linkers L1 and L12 (Ahn et al., 2019). Lamins have several differences from cytoplasmic IFs: 1) they contain 42 additional amino acids

in their rod domain; 2) they have a shorter head domain; and 3) their carboxyl-terminal “tail domain includes the nuclear localization signal (NLS)—which is required for their nuclear transport after synthesis in the cytoplasm—, an immunoglobulin-like (Ig-) fold domain, a chromatin binding site, and—with the exception of lamin C—a CaaX motif (where C is cysteine, a—an aliphatic amino acid, and X—any amino acid) (Gruenbaum and Foisner, 2015; Wu et al., 2014) (Figure 2).

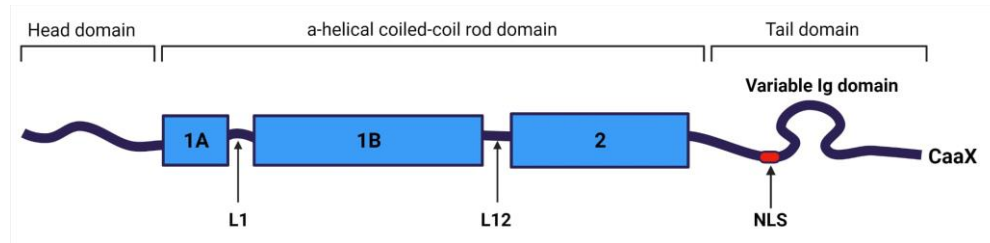


Figure 2. Structural organization of lamin A/C filament (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Lamin C is translated as a mature protein without multiple post-translated modifications as in the case of A-type lamin, and lacking 98 amino acids with CaaX motif; A-type lamin is expressed in cells as prelamin, which undergoes multiple post-translational modifications of the carboxyterminal “tail” domain. At the first stage of prelamin A processing, farnesyltransferase enzyme (FTase) adds a farnesyl group to the C-terminal cysteine. Then the three residues (aaX) are cleaved via the zinc metalloprotease Zmpste24 (FACE1) or RAS converting enzyme 1 (Rce1). At the next stage C-terminal cysteine is carboxymethylated by the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). Finally, enzyme Zmpste24 cleaves the last 15 C-terminal amino-acids of lamin A, thereby removing the carboxy farnesylated and methylated cysteine (Adam et al., 2013; Corrigan et al., 2005; Fisher et al., 1986; Wu et al., 2014). Figure 3 presents the lamin A post-translational modifications during maturation.

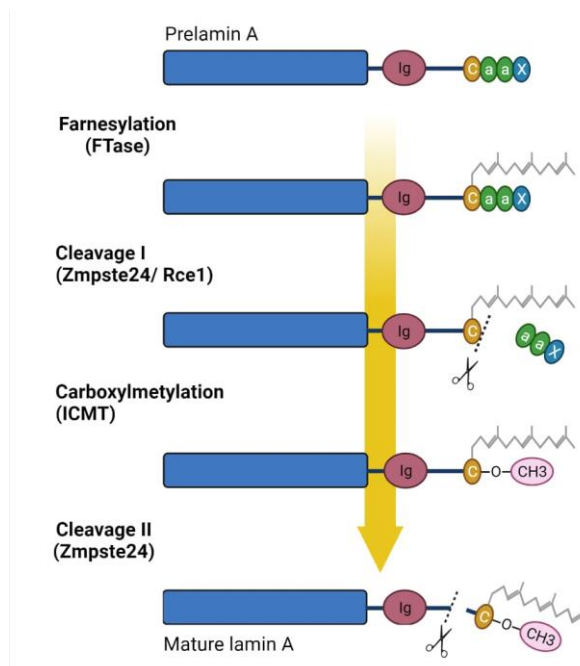


Figure 3. Serial stages of prelamin A processing (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Other types of post-translational modifications of lamins are known such as sumoylation, ubiquitylation, acetylation, and phosphorylation. These modifications obviously play a significant role in regulating lamin translocation during the cell cycle (Donnaloja et al., 2020; Prokocimer et al., 2009). Phosphorylation of lamins is involved in plenty of cellular process. To date, some research has shown that phosphorylation contributes to the interaction between B-type lamins and histone H2A/H2B in *Drosophila* (Mattout et al., 2007). In mammalian cells two specific sites flanking the lamin's rod domain are phosphorylated by cyclin-dependent kinase (CDK)-1. This event is required for lamin disassembly into dimers during mitosis. (Chaffee et al., 2014; Naetar et al., 2017). Moreover, phosphorylation contributes to the dynamic interaction of lamins with other proteins as well as lamin A/C solubility, and lamina meshwork formation. Remarkably, all these processes could be activated/inactivated, as phosphorylation is a reversible modification (Kochin et al., 2014; Liu & Ikegami, 2020). Apparently, lamin phosphorylation takes place in the modulation of enhancer activity. It has been reported that S22-phosphorylated lamins connect with active genomic enhancer sites and this interaction is violated in progeroid cells (Ikegami et al., 2020). Sumoylation has been shown to be important for normal lamin A/C functions and also for the regulation of lamin A/C assembly (Kim et al., 2011). It has been shown that mutant lamin A/C (E203G and E203K) leads to a decreased level of lamin sumoylation in fibroblasts and increased cell death (Zhang & Sarge, 2008).

The main structural unit of lamin A/C filaments is a coiled dimer formed as a result of the interaction of two central rod domains of lamin proteins. These dimers are connected head-to-tail and form protofilaments, which could be combined in various configurations to form 10 nm lamin filaments (Gruenbaum and Foisner, 2015; Herrmann and Aebi, 2004; Prokocimer et al., 2009). The structure of the lamin "tail" domain is similar to immunoglobulin and could mediate specific intermolecular interactions with other proteins (Donnaloja et al., 2020) (Figure 4).

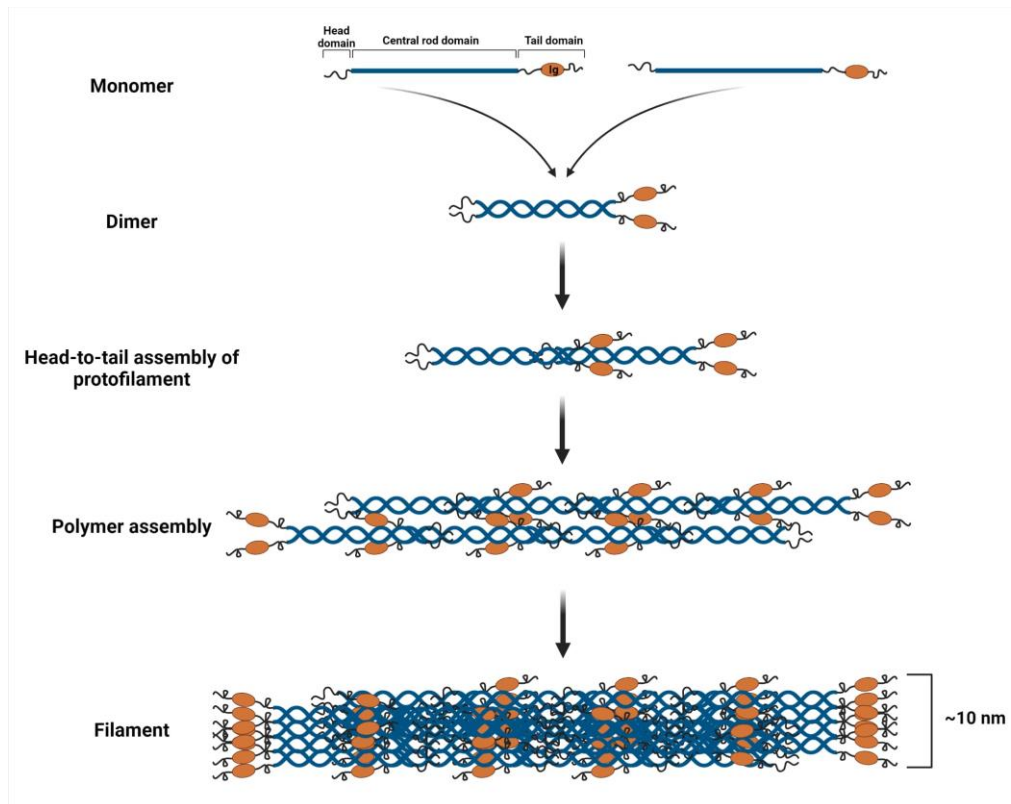


Figure 4. Steps of lamin A/C assembly (Malashicheva and Perepelina, 2021).

1.3 Lamin A/C-binding proteins

All lamin A/C functions from maintaining nucleus shape to participations in more comprehensive processes (including signaling transduction, and cell differentiation) are performed due to the diversity of lamin A/C-binding proteins (Enyedi and Niethammer, 2017; Gruenbaum and Foisner, 2015; Karoutas and Akhtar, 2021; Naetar et al., 2017).

Lamin A/C-binding proteins consist of three general groups: (1) proteins that perform mechanical support of the nucleus; (2) components of signaling pathways (3) proteins involved in gene expression and chromatin organization regulation (Gruenbaum & Foisner, 2015; Martino et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Among lamin A/C-associated proteins, emerin, LAP (leucine-rich repeats and PDZ domains), and MAN1 proteins are more important. LAP2, emerin, and MAN1 (called LEM proteins) contain a special 40 amino acid domain called the LEM domain that interacts with the barrier to autointegration factor (BAF), a DNA-binding factor involved in chromatin structure organization and nuclear envelope assembly. There are LEM proteins that lack a transmembrane domain and are therefore located in the nucleoplasm or cytoplasm (Brachner and Foisner, 2011). In addition to their BAF-mediated influence on chromatin structure, lamins interact with the epigenetic regulator ING (inhibitor of growth), which binds to core histones, deacetylases, and histone acetyltransferases, as well as to mediators of epigenetic regulation. Moreover, lamin A/C can also interact directly with chromatin by binding specific regions of chromatin called lamina-associated domains (LADs) at the nuclear periphery (Shevelyov and Ulianov, 2019) (Figure

5).

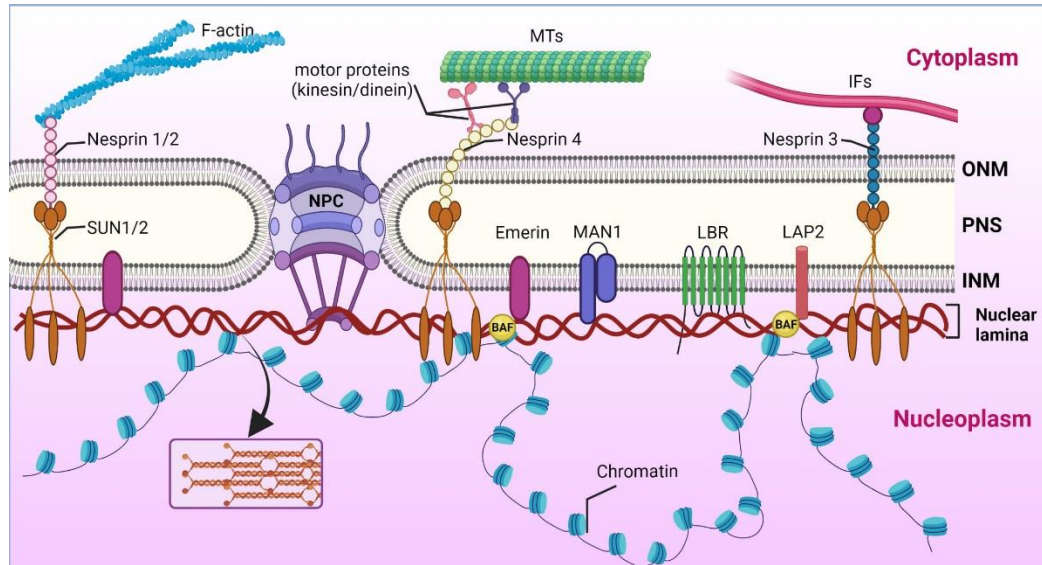


Figure 5. Interrelations lamin A/C with nuclear envelope proteins and chromatin. INM – inner nuclear membrane; NPC – nuclear pore complex; ONM – outer nuclear membrane; F-actin – filamentous actin; MTs – microtubules; IF – intermediate filaments; PNS – perinuclear space (Malashicheva and Perepelina, 2021).

SUN and KASH domain proteins are important nuclear membrane proteins localized in the INM and ONM (outer nuclear membrane), respectively. The SUN proteins interact directly with lamin A/C. KASH proteins bind to major cytoskeleton members, including actin filaments (through nesprin-1 and -2), intermediate filaments (via interaction with nesprin-3), and microtubules (via kinesin and dynein motor proteins binding to nesprin-1, -2, -4 and KASH5) (Haque et al., 2006). Thus, SUN and KASH domain proteins, nesprins, together with lamin A/C, form a protein complex called the LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) complex, which unites the nucleus and the cytoskeleton and enables force transmission across the nuclear envelope during nuclear positioning and migration (Lee and Burke, 2018).

In addition, through protein–protein interactions, A-type lamins are believed to interact with and regulate the activity and availability of important signaling pathway proteins in the cell, such as Rb/E2F, Wnt/ β -catenin, TGF β , SMAD, and MAPK (Gerbino et al., 2018; Worman, 2018).

1.4 Lamin A/C participation in tissue-specific regulation of cell differentiation

1.4.1 Lamin A/C role in mechanosignaling defining cell differentiation

Currently, the role of lamin A/C in mechanosignaling is considered to be essential for regulating vital processes in the cells including migration, homeostasis, growth, and differentiation (Donnalaja et al., 2020; Martino et al., 2018). Mechanosignaling is the cell's ability to modulate the mechanical signals into a biological response by acting on several cell functions above. In this case, lamin A/C serve as mechanosensor, receiving external stimuli from the extracellular matrix (ECM), and then transforming

them into internal biological responses. Thus, lamins are mediators, helping the cells to adapt to a changing microenvironment (Guilluy et al., 2014; Isermann and Lammerding, 2013; Martino et al., 2018; Osmanagic-Myers et al., 2015).

The first piece of knowledge about the fact that external mechanical force could lead to cell response resulting in nucleus deformation was obtained by Maniotis and colleagues in the 1990s (Maniotis et al., 1997). Since then, knowledge has been accumulating about the mechanisms underlying the signal transduction from the exogenous environment through the cytoplasm to the nucleus.

ECM includes many components (proteins, glycosaminoglycans, and proteoglycans) that impact the cell surface in a specific manner. The most common of them are collagen, laminin, and fibronectin (Figure 6). The ECM composition is unique for a given tissue and could be changed in response to alteration of the environment, especially in the case of a disease (Bonnans et al., 2014). The mechanical signal from ECM is transmitted to membrane-bound integrins that perform a sensor role. Integrins mediate the transformation of mechanical stimuli into biochemical signals. Interestingly, depending on the quantity and type of integrins, cells can react in a different way (Israeli-Rosenberg et al., 2014). Through the accumulation of proteins termed focal adhesion complex (FAC), integrins are associated with the cytoskeleton. FAC proteins, such as talin, α -actinin, and vinculin, define the strength of interaction between integrins and filamentous actin (F-actin), which is a general cytoskeleton component (Chin et al., 2019). Then the signal is translocated via the LINC complex to nuclear lamins, the main sensors of mechanotransduction (Figure 6).

The importance of lamin A/C in mechanotransduction was confirmed in studies where cells lacking lamin A/C or expressing *LMNA* mutants were unable to directly transmit forces to the nucleus (Poh et al., 2012).

Despite the identification of a spectrum of molecular components involved in mechanotransduction, it remains completely unknown how these components act and adapt to each other to affect cellular functions and stem cell fate. The differentiation process is believed to be mechanosensitive, and cell fate could be determined by type and physical force of external stimuli. Current proposed model could be as follows. During cell differentiation A-type lamins get information about the changing microenvironment from nearby cells and ECM through the cytoskeleton. This leads to a rearranging meshwork and chromatin structures, or urges conformational changes in nuclear proteins such as transcription factors and components of signaling pathways. It is supposed that these conversions lead to chromatin segments' translocation away from or to the lamina, resulting in activation/repression of differentiation-related genes (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Swift et al., 2013).

The physical properties of tissues are an important factor in determining the fate of cells. Some researchers have revealed correlations between substrate stiffness and gene transcription intensity of lamin A/C in a tissue-specific manner. For instance, Heo and colleagues have demonstrated that low external

stimuli promote mesenchymal stem cell (MSC) to adipogenic differentiation associated with inhibited lamin A/C production (Heo et al., 2016). Other authors revealed that medium force stimuli induce MSC to differentiate into myocytes' direction, which is accompanied by elevation of lamin A/C expression (Engler et al., 2006; Swift et al., 2013). In addition, high lamin A/C expression level of hard tissues (such as bone) stabilizes the nucleus against mechanical stress. At the same time, soft tissues, such as fat, are characterized by a low expression level of lamin A/C. It has been demonstrated that lamin A/C knockdown enhances mesenchymal stem cell differentiation on a soft matrix, which contributed to fat phenotype development. In contrast, lamin A/C overexpression enhances cell differentiation on a stiff matrix toward a bone phenotype (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Swift et al., 2013). In addition, lamin A/C overexpression leads to an inhibition of chromatin remodeling, and also to an activation of other actions such as expression of stress-related proteins implicated in cell differentiation, and transcriptional regulator YAP1 involved in cell proliferation and the suppression of apoptotic genes and Hippo pathway (Swift et al., 2013).

Thus, via adhesion proteins and cytoskeleton meshwork, ECM transmits information into the nucleus about the microenvironment to stabilize proper shape and stiffness of the nucleus by means of the quantity of lamins. High lamin A/C expression protects all components of the nucleus from severe forces coming from a stiff ECM, for example in a bone tissue. This mechanism reflects a mechanical theory of lamin A/C's role in the cells (Osmanagic-Myers and Foisner, 2019) (Figure 6).

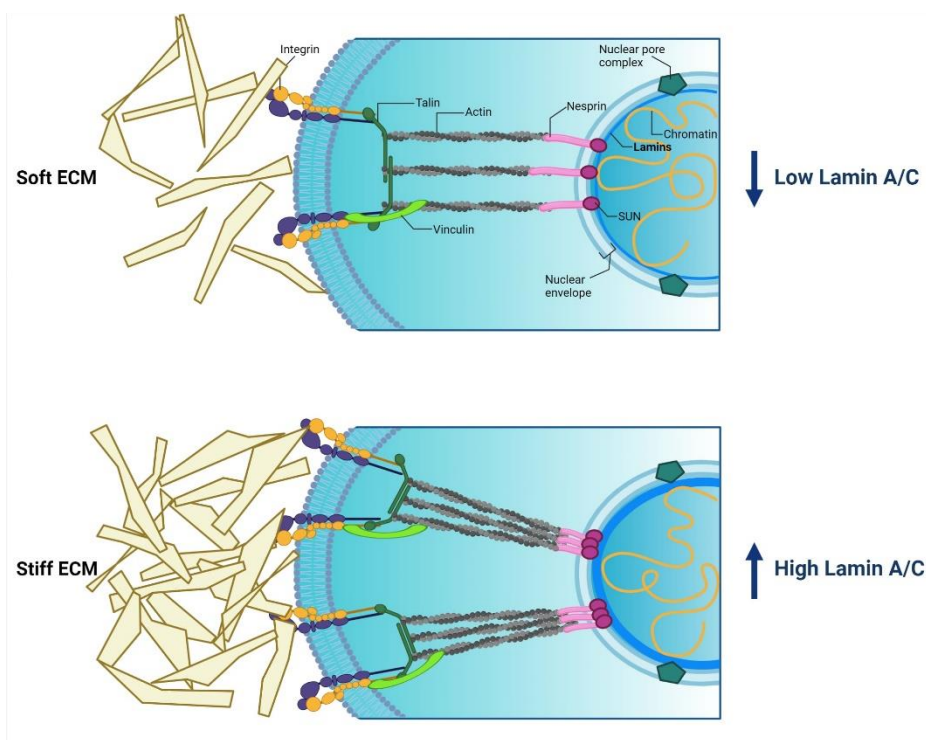


Figure 6. Regulation lamin A/C expression in the cells of soft and stiff tissue via mechanotransduction (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Some researchers have demonstrated the importance of the Ig-domain of lamin A/C in stress-related changes in terms of lamina rearrangement. In response to stress, electrostatic interaction between the

positively charged Ig-tail domain and negatively charged regions of the rod domain of a nearby lamin's filament is disrupted, resulting in lamina reorganization (Makarov et al., 2019).

Thus, the expression level of lamin A/C determines tissue-specific differentiation of cells. In this way, mechanical signals coming from the intercellular matrix can direct lamins to proper stabilization of the genome in response to mechanical stress and tissue-specific gene expression during cell differentiation. These events are necessary to support nucleus shape and prevent the DNA from breaking.

1.4.2 Lamin A/C role in regulation chromatin organization and gene expression

Genomic DNA in the eukaryote nucleus is known to be extensively packaged in chromosomes, each of which occupies a certain area termed the chromosome territory (Cremer & Cremer, 2010). According to transcriptional activity, chromatin is divided into euchromatin, which includes the majority of actively expressed genes, and heterochromatin, including transcriptionally inactive genes. Heterochromatin mostly occupies the nuclear periphery, whereas euchromatin is localized in the interior part of the nucleus. In addition, heterochromatin is sub-divided into constitutive heterochromatin, which is localized in the pericentromeric and subtelomeric regions of chromosomes, and facultative heterochromatin, localized in chromosome shoulders (Lieberman-aiden et al., 2009; Ou et al., 2017). It has been shown that heterochromatin is associated with lamin A/C forming the nuclear lamina, while euchromatin dominating in the nuclear interior is connected with a small number of nucleoplasmic lamin A/C. A-type lamins are considered to regulate the repressive state of genes included in facultative heterochromatin (Bitman-Lotan and Orian, 2021; de Leeuw et al., 2018; Gruenbaum and Foisner, 2015). This three-dimensional organization of chromatin contributes to the gene expression regulation and maintenance of silencing of heterochromatic genes.

Nowadays, the multiplicity of methods such as super-resolution microscopy (Cremer et al., 2017; Ricci et al., 2017), chromosome capture methods (Dekker et al., 2002), and chromatin immunoprecipitation (ChIP) allow deeper investigation of 3D nuclear architecture (Collas, 2010; Oldenburg & Collas, 2016). In this way direct interactions of chromatin with lamin A/C were identified using DNA adenine methyltransferase identification (DamID) (Van Steensel & Henikoff, 2000; Guelen et al., 2008) and chromatin immunoprecipitation methods (Lund et al., 2014; Lund et al., 2015). These regions now are broadly known as lamina-associated domains (LADs). Approximately 30-40 % of the genome is occupied by LADs, which contain different gene sets in a silent state according to the particular type of cells. Moreover, it has been suggested that lamin A/C located in the nuclear interior as well as peripheral lamin A/C (as a part of lamina) are involved in gene repression (Naetar et al., 2017). Similar to heterochromatin, there are facultative and constitutive LADs (fLADs and cLADs respectively). The set of cLADs is very identical in cells from several origins. Conversely, fLADs are unique for different cells types (Melcer and Meshorer, 2010). During several studies, it has been demonstrated that fLADs are spatially positioned in

tissue-specific and embryo stage-dependent ways (Poleshko et al., 2019, 2017; Robson et al., 2016). Recent research conducted on induced pluripotent stem cells (iPSC) carrying a tissue-specific *LMNA* mutation has confirmed this fact and determined that disruption of lamin–chromatin bonds occurs in regions with specific characteristics. Using three cell types such as cardiomyocytes (iPS-CMs), adipocytes (iPS-adips), and hepatocytes (iPS-heps), obtained from iPSC with one of the two cardiac-specific *LMNA* mutations (T10I and R541C), it has been determined that LADs have cell-specific organization. Moreover, cardiac-specific *LMNA* mutations have a more destructive effect on iPS-CMs compared with iPS-adips and iPS-heps (Shah et al., 2021).

During mitosis, dividing cells undergo some nuclear events, including release of transcription factors and chromatin reorganization accompanied by rearrangement of LADs. Interestingly, these cell-type-specific changes could be reconstructed after mitosis (Shevelyov and Ulianov, 2019). The molecular mechanisms of maintenance of cell-specific orientation of LADs remain unknown. Also, it is not fully clear how chromatin is attached to nuclear lamina.

Multiple interactions of the genome and lamina along large LAD regions are known to be dependent on histone post-translational modifications. Poleshko and colleagues have demonstrated that the H3K9me2 mark takes part in 3D spatial heterochromatin organization at the nuclear periphery, and re-associates with the forming nuclear lamina after mitosis (Poleshko et al., 2019). Besides, H3K27me3 marks, as well as CTCF binding sites, flank LADs, mediating their anchoring to the nuclear envelope (Harr et al., 2015).

In addition, apart from lamin A/C participating in chromatin organization, INM proteins can bind genome regions with nuclear lamina, resulting in gene silencing. So it has been shown that LBR is connected with the histone modification H3K9me3 through heterochromatin-binding protein 1 (HP1) (Hirano et al., 2012). Emerin is able to interact with HDAC3 by initiating its catalytic activity (Demmerle et al., 2012). The LAP2 β protein plays a critical role in genome organization, gene expression and differentiation process via interaction with the ATP-dependent chromatin remodeling complex BAF (mammalian SWI/SNF complex) (Margalit et al., 2007). There are more examples of the involvement of INM proteins in the regulation of chromatin architecture which can be found in previous reviews (Cai et al., 2001; Zuleger et al., 2011).

The processes of maintaining stem cells in a pluripotent state, as well as their decision to differentiate in a certain direction, are under regulation via complex intracellular programs. These programs can be realized throughout changes of the activity of transcription factors, chromatin organization reconstitutions, epigenetic regulator activity, and many other events. In this regard, it is worth noting the exclusive role of lamin A/C as a part of chromatin organization and regulation of differentiation-related gene expression, resulting in the cell's choice of further fate and specification of an identity. During cell differentiation, spatial relocation of genomic regions towards or away from lamina occurs, as is shown in Figure 7. Thus, genes non-relevant to differentiation interact with lamina and become silent. At the same time,

differentiation-related genes unattached from lamina are available for their expression, facilitating the development of a particular cell identity (Bitman-Lotan and Orian, 2021) (Figure 7).

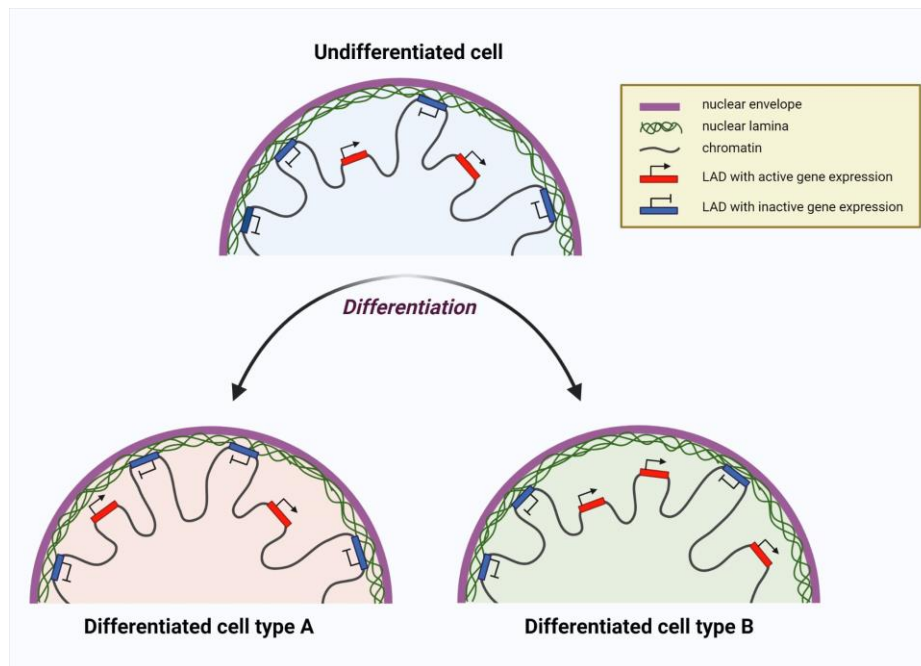


Figure 7. Alteration of the spatial organization of the lamin-chromatin interactions within cell differentiation (Malashicheva and Perepelina, 2021).

The active role of lamin A/C in stem cell identity and cell differentiation has been investigated in several studies. For example, during myogenesis some genes move in and out of LADs in a specific way, leading to changes in their expression state. Some of these genes encode NETs (see above). This tissue-specific NET expression is significant for selective chromosomes docking near the nuclear periphery (Robson et al., 2016). Our group has shown an impact of various *LMNA* mutations on unique expression pattern of genes during MSC differentiation (Malashicheva et al., 2015).

Besides the functions described above, A-type lamins bind to the retinoblastoma protein pRb, one of the main cell cycle regulators, and are also involved in the regulation of apoptosis and in the processes of muscle and adipogenic differentiation (Boban et al., 2010; Kennedy and Pennypacker, 2014). Lamin A/C involvement in cell differentiation is also confirmed by the direct interaction of lamin A/C with cyclin D3 in muscle cells as well as with SREBP1, an important factor of adipogenic differentiation, in pre-adipocytes (Mariappan et al., 2007). The complex of lamin A/C and emerin could also interact with α -catenin and thereby determine the onset of adipogenesis (Boban et al., 2010). In addition, A-type lamins retain factor c-Fos at the nuclear periphery, which leads to the repression of transcriptional activity of AP-1 factor, a well-known regulator of cell proliferation, differentiation, and apoptosis (Mirza et al., 2021). Thus, A-type lamins are associated with many transcriptional regulators in the nucleus and can influence gene expression by binding to these factors or by affecting the basic transcriptional complexes assembly.

The C-terminal immunoglobulin-like domain of lamin A/C directly interacts with the PCNA

replication factor, which plays an important role in DNA replication (Cobb et al., 2016; Shumaker et al., 2008). In natural conditions, lamin A/C expression leads to inhibition of PCNA and dephosphorylation of Rb, which consequently inactivates transcription factors of the E2F group. This leads to the arrest of the cell cycle, suppression of DNA replication, and initiation of the differentiation process. Impaired lamin A/C expression could lead to phosphorylation of Rb by the cyclin D - cdk4/6 complex and the release of transcription factor E2F. As a result, cells do not proceed to the process of differentiation, and the apoptotic mechanisms are activated (Chen et al., 2019).

Despite many discoveries regarding the role of lamin A/C in the regulation of gene expression and chromatin organization, there is still no clear understanding of all the molecular participants in these processes. Given the complexity and distinction of each specific cell type mechanism of differentiation regulation, further studies are needed on the development mechanism of severe hereditary diseases associated with impaired tissue differentiation—laminopathies.

1.4.3 Lamin A/C cooperation with signaling pathways during cell differentiation

Aside from the lamin A/C functions discussed above, they are capable of modulating the activity of signaling molecules via their interaction with gene regulators, promoters, and the other components of signaling cascades in the cells.

Intermolecular interactions of lamin A/C with plenty of molecular signaling components or their intermediates occur due to different posttranslational modifications that lamin A/C may undergo (Gerace and Tapia, 2018; Maraldi et al., 2010). As a whole, post-translational modifications of lamin A/C can be subdivided into phosphorylation, sumoylation, farnesylation, and carboxymethylation. However, the influence of these modifications on lamin A/C cooperation mechanisms with other molecules and proteins remains largely unknown (Andrés and González, 2009; Gerbino et al., 2018).

1.4.3.1 Wnt/ β -catenin

The Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a decisive role in the differentiation of various cells via regulation of the genes involved in mesenchymal tissue proliferation and differentiation. It has been shown that β -catenin (intracellular signal transducer in the Wnt/ β -catenin signaling) is capable of interacting with lamin-binding protein emerin, thereby controlling the expression level of emerin in differentiated cells. Inhibition of GSK3 kinase, an important step in β -catenin activation, is required for adipogenic lineage differentiation. In contrast, GSK3-kinase activation leads to differentiation of stem cells towards the osteogenic lineage (Maraldi et al., 2011). Using knockout mice (*Lmna* $-/-$), Tong and colleagues have shown that the absence of lamin A/C synthesis leads to suppression of myogenic and osteogenic cell differentiation, which correlates with an increase of adipose tissue content and with expression of

adipogenic markers, as well as with decreased activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Tong et al., 2011). The implication of Wnt/ β -catenin signaling in osteogenic differentiation promotion of MSCs was confirmed in several studies (Tong et al., 2011; Wang et al., 2017), whereas adipogenic and chondrogenic direction of differentiation was suppressed when Wnt/ β -catenin was activated (Case and Rubin, 2010; Ullah et al., 2015).

1.4.3.2 Notch pathway

Notch signaling is a key regulator of main cellular processes including proliferation, differentiation, and apoptosis in both the adult organism and the developing embryo (Hori et al., 2013; Schwanbeck et al., 2011). The Notch pathway includes four Notch receptors (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), five ligands (Jag-1, Jag-2, DLL1, DLL3, DLL4), and gene regulators. Receptors and ligands are mainly transmembrane forms of proteins that ensure the interaction of neighboring cells with each other. Notch receptors undergo sequential proteolytic cleavages upon binding of their ligand, resulting in the release of Notch intracellular domain (NICD) from the cellular membrane. NICD is translocated into the nucleus, where it interacts with transcription factors, thereby activating expression of target genes (Andersson et al., 2011; Henrique and Schweisguth, 2019).

Notch is established to regulate the cell differentiation process (Bray, 2006). Moreover, the involvement of Notch signaling in Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) has been shown (Pereira et al., 2008). HGPS is associated with expression of a truncated form of prelamin A called progerin, whose accumulation mainly leads to abnormal nuclear shape and chromatin structure. Thus, mostly mesenchymal tissues are thought to be damaged. Scaffidi and Misteli showed that the expression of progerin in human MSCs causes hyperactivation of the main targets of the Notch signaling pathway—*HEY1* and *HES1* (2008). This contributes to a change in the expression of differentiation markers: enhanced adipogenic and reduced osteogenic ones. However, changes in the chondrogenic differentiation in the cells carrying the mutation, in contrast to the wild-type *LMNA*, were not observed. As a possible mechanism, it has been suggested that the presence of progerin causes a disruption of a connection of lamin A/C with the transcription factor SKIP, an activator of genes of the Notch family, thereby increasing Notch-related gene expression inside the nucleus. In addition, Notch genes probably can directly interact with the nuclear lamina, and their regulation is associated with epigenetic modifications (Scaffidi and Misteli, 2008).

The impact of various *LMNA* mutations on the Notch pathway during differentiation of the cells of various mesenchymal origin has been reported. In our previous work, we proposed that the cooperation of lamin A/C with Notch signaling could be one of the mechanisms regulating MSC differentiation, based on the facts that tissue-specific *LMNA* mutations are able to influence the Notch signaling activity in MSCs (Bogdanova et al. 2014). Thus, specific mutations in the *LMNA* gene are implicated in functional changes of Notch signaling during cell differentiation.

1.4.3.3 TGF- β /Smad pathway

There is considerable evidence that the TGF- β /Smad pathway is involved in bone abnormalities via contravention of the osteogenic differentiation process. Smad2 is known to interact with lamin-binding protein MAN1. Kondé and colleagues described in more detail this interaction via structural analysis, and revealed a UHM domain of MAN1 participating with Smad2-MAN1 link (Kondé et al., 2010). Heterozygous loss-of-function mutation in the *MAN1* gene leads to bone abnormalities in humans, such as osteopoikilosis (sclerotic bone lesions) with or without manifestations of Buschke-Ollendorff syndrome, and melorheostosis (aberrant growth of new bone tissue on the surface of existing bones). These abnormal changes lead to increasing bone density and overexpression of TGF- β (Hellemans et al., 2004). It has been shown that MAN1 could be implicated in inactivation through competition with transcription factors for binding to Smad2 and Smad3, and it contributes to their dephosphorylation by phosphatase PPM1A (Bourgeois et al., 2013). In addition, lamin A/C can impact TGF- β /Smad signaling activity via interplay with protein phosphatase 2A (Van Berlo et al., 2005). To understand how A-type lamins facilitate functional changes of TGF- β /Smad pathway, further research is obviously needed.

1.4.3.4 MAPK (ERK) pathway

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the cell cycle and differentiation process (Maraldi et al., 2011). A-type lamins mediate retaining c-Fos (transcription factor that regulates key cellular processes, including differentiation) at the periphery of the nucleus. Cooperation of lamin A/C with c-Fos factor could be disrupted due to phosphorylation of c-Fos by MAPK Erk. This result suggests the participation of lamin A/C in MAPK pathway activity (González et al., 2008). In knockout mouse models of dilated cardiomyopathy with the *LMNA* H222P mutation in response to mechanical stress in cardiomyocytes, activation of the MAPK signaling pathway was observed, in which kinases such as ERK1/2 and JNK were involved. In addition, inhibitors of this signaling pathway were found to prevent the development of cardiomyopathies associated with a mutation in the *LMNA* gene, but did not affect the development of muscular dystrophy (Muchir et al., 2007).

Thus, A-type lamins are associated with many signaling pathways and transcriptional regulators in the nucleus and could influence gene expression by binding to these factors or by affecting the assembly of basic transcriptional complexes.

1.5 Laminopathies

Laminopathies are a group of hereditary diseases caused by mutations in genes encoding a) nuclear lamins; b) proteins associated with post-translational modifications of lamins (such as ZMPSTE24); c) proteins that interact with lamins (emerin, LAP2, LBR, MAN1, nesprins) and d) proteins that make up

nuclear pores (Zaremba-Czogalla et al., 2011).

Over the past 20 years, it has been found that most laminopathies are caused by mutations in the *LMNA* gene, which encodes lamin A/C. To date, over 15 different diseases have been described, associated with 498 mutations in the *LMNA* gene (<http://www.umd.be/LMNA/>). Laminopathies are characterized by a wide range of clinical phenotypes, in which one type of tissue is most often affected, mainly of mesenchymal origin, for example, lipodystrophy (damage to adipose tissue), mandibuloacral dysplasia (damage to bone tissue), cardiomyopathy and muscular dystrophy (damage of the heart and skeletal muscles) (Rankin and Ellard, 2006). There are some groups of laminopathies in which different tissues are affected, resulting in overlapping or systemic phenotypes (Bertrand et al., 2011; Crasto and Di Pasquale, 2018; Zaremba-Czogalla et al., 2011) (Figure 8).

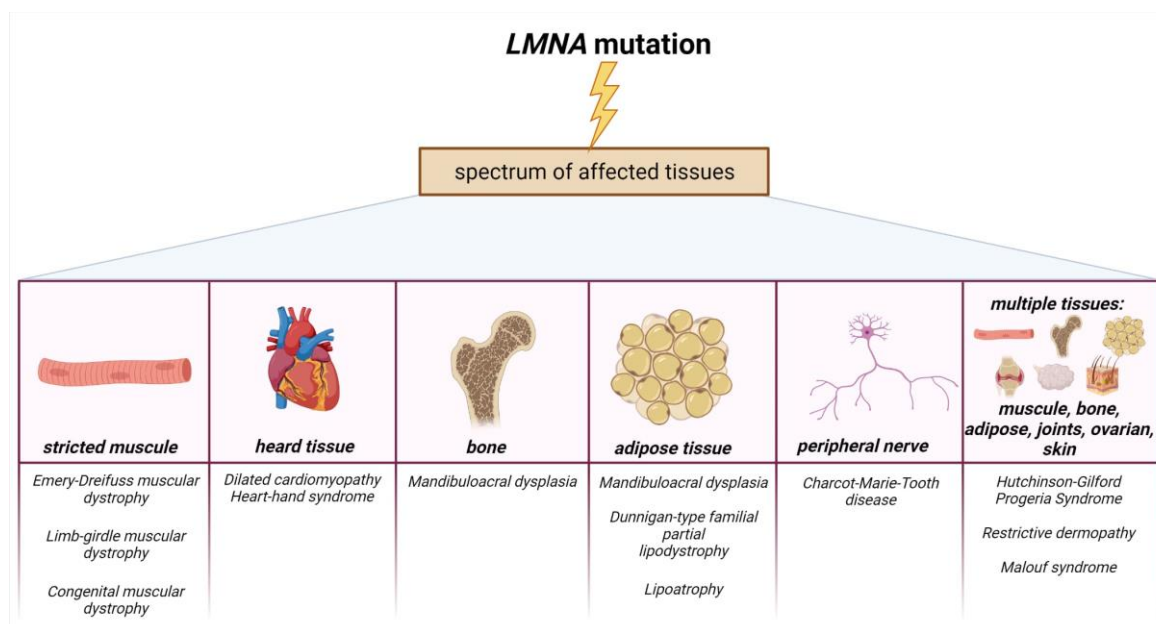


Figure 8. Variability of diseases caused by mutations in the *LMNA* gene (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Premature aging syndrome, also known as progeria, is one of the best-studied human diseases with overlapping phenotypes, in which several tissues are affected. The pathology is caused by mutations in the *ZMPSTE24* gene, mutations in the *LMNA* gene, as well as by mutations in genes encoding DNA repair proteins, such as in RecQ protein-like helicases (RECQLs) and nuclear excision repair (NER) proteins and others (Navarro et al., 2006). The most famous form of progeria is Hutchinson-Gilford syndrome (Rankin and Ellard, 2006; Worman et al., 2010). This is an extremely rare autosomal dominant disease, a childhood form of progeria, characterized by changes in the skin and internal organs caused by premature aging of the body. In 2003, the mechanism of this disease development was described. A mutation in the *LMNA* gene causes the substitution of cytosine with thymine amino acid, thus forming an additional splice site in exon 11, resulting in a truncated mRNA of *LMNA* transcript. In the process of translation, an altered form of prelamin A is synthesized, in which the CaaX motif is not cleaved, and instead of the mature lamin A, the

progerin protein is formed, which cannot be incorporated into the nuclear lamina resulting in disruption the scaffold of the nucleus (Gonzalo et al., 2017).

Unlike HGPS, for other diseases associated with mutations in the *LMNA* gene, the molecular mechanisms of pathogenesis are still poorly understood. Most mutations in the *LMNA* gene affect the heart or skeletal muscles. Among such diseases, Emery-Dreifuss autosomal dominant and recessive forms of muscular dystrophy (EDMD) could be distinguished (Worman, 2012). The disease was found to be associated with the R453W point mutation of the *LMNA* gene mapped to locus lq 21.2-21.3 (Favreau et al., 2004b). Later, missense mutations were found, for example, G232E, Q294P and R386K, leading to the development of EDMD (Muchir and Worman, 2007). Other diseases of the heart and skeletal muscles associated with mutations in the *LMNA* gene were soon described: dilated cardiomyopathy 1A (Fatkin et al. 1999) and limb-girdle progressive muscular dystrophy 1B (Muchir et al., 2000). EDMD, isolated dilated cardiomyopathy, and limb-girdle muscular dystrophy are characterized by overlapping clinical phenotypes and dilated cardiomyopathy associated with cardiac conduction abnormalities (Cattin et al., 2013).

Dunnigan-type familial partial lipodystrophy, also known as FPLD, is an autosomal dominant disorder characterized by a loss of hypodermic adipose tissue in the limbs and torso after puberty and excess fat deposition in the head and neck region. A total of 90% of the *LMNA* mutations in this syndrome are missense mutations located in exon 8 (Boguslavsky et al., 2006). Several such mutations have been described, for example, R482Q, R482W, G465D in exon 8, and R582H in exon 11 of the *LMNA* gene (Garg et al., 2001).

Mandibuloacral dysplasia (MAD) is a rare autosomal recessive disorder characterized by postnatal bone anomalies. MAD occurs due to point *LMNA* mutations associated with amino acid substitutions (Garg et al., 2005). Mandibuloacral dysplasia could also be caused by mutations in the ZMPSTE24 protease, involved in the processing of prelamin A to lamin A/C (Agarwal et al., 2003).

Thus, these few main examples of laminopathies demonstrate that mutations in the same *LMNA* gene could lead to the development of severe abnormalities, characterized by a wide range of clinical tissue-specific phenotypes. However, the mechanism of development of these diseases is still not fully understood.

Several years ago, scientists proposed two hypotheses explaining the development of laminopathies: a structural hypothesis and a gene expression hypothesis. According to the structural hypothesis, mutations in the *LMNA* gene cause, first of all, weakening of the nuclear membrane, which makes it vulnerable to damage resulting in cell death and a replacement of differentiated tissue in specific cells. Another hypothesis is based on molecular mechanisms, and is related to the fact that A-type lamins are regulators of gene expression of some proteins, and mutations in the *LMNA* genes, therefore, disrupt their regulatory capacity and contribute to the disease development (Osmanagic-Myers and Foisner, 2019). Currently, there is evidence for both hypotheses. However, it is interesting that cluster analysis of *LMNA* mutations gives preference to one or another hypothesis depending on the localization of *LMNA* mutations associated with

a particular type of laminopathies. Thus, it has been shown that mutations in the *LMNA* gene located upstream of the nuclear localization signal (NLS) affect the conserved core domain necessary for the formation and maintenance of the integrity of the nuclear cytoskeleton, while mutations located downstream interact more closely with chromatin and transcription factors (Hegele, 2005). Since the first group of mutations is mainly associated with a large group of muscular dystrophies and cardiomyopathies, scientists suggested that the causes of these diseases are, first of all, a violation of the formation of the lamina structure and mechanical defects. The second group of mutations belongs to other types of laminopathies—in particular, to progeroid syndromes, FPLD and MAD—and is most likely associated with disturbances in the interaction and regulation of important signaling pathways in the cell (Cattin et al., 2013) (Figure 9).

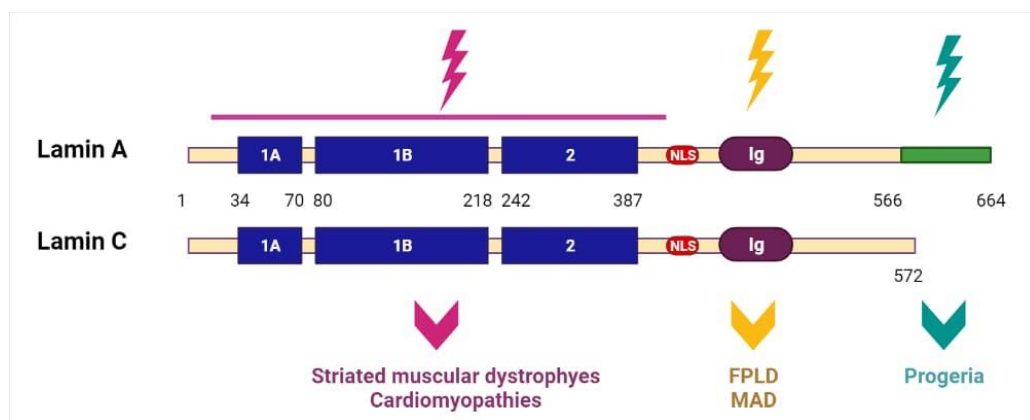


Figure 9. Correlation between localization of the *LMNA* mutations and disease phenotype (Malashicheva and Perepelina, 2021).

Recently, research has mainly focused on the study of the molecular mechanisms of the development of laminopathies (Alcorta-Sevillano et al., 2020; Osmanagic-Myers and Foisner, 2019; Shah et al., 2021). The molecular mechanisms proposed by scientists include disturbances in the organization of heterochromatin, intracellular signal transduction, and in the process of autophagy, which ultimately leads to the regulation of the expression of various genes (Wong and Stewart, 2020) (Literature review from Malashicheva and Perepelina, 2021).

2. MATERIALS AND METHODS

All studies were carried out at the Research Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics of the Research Institute of Molecular Biology and Genetics of the Federal Medical Research Center V. A. Almazova (St. Petersburg, Russia). All work with human material had permission from the local ethical committee of the Almazov National Medical Research Centre.

2.1 Cell cultures

The following cell cultures were used in the work:

- Mouse satellite cells
- Mouse myoblasts C2C12
- Human umbilical vein endothelial cells (EC)
- Human mesenchymal cardiac cells (CMC)
- Human aortic smooth muscle cells (SMC)
- Interstitial cells of the human aortic valve (IC)
- Human induced pluripotent stem cells (iPSC)
- HEK 293-T cell line

2.1.1 Isolation and cultivation of mouse satellite cells

Mouse satellite cells were isolated from the soleus muscle of C57BL/6 males (weighing 16-18 grams). The soleus muscle was isolated and placed in DMEM medium (Invitrogen, USA) with penicillin-streptomycin (Invitrogen, USA). Isolated muscles were treated with 0.1% collagenase type I solution (C0130, Sigma, Germany) for 90 min at 37°C. Next, the muscles were centrifuged in 15 ml tubes at 300 g for 5 min. The supernatant was removed, and the pellet was intensively resuspended in 3 ml of wash medium (DMEM, 10% horse serum (LS), 1% antibiotic) and incubated for 5 min. The washing procedure was repeated one more time. The twice collected supernatant was centrifuged at 1000 g for 10 min. The obtained cell pellet was dissolved in 0.5 ml of the culture medium (DMEM with the addition of 20% FBS, 10% LS, 1% chicken embryonic extract and 1% antibiotic).

Cells were cultured on Geltrex-coated (Invitrogen, USA) dishes at 37°C, 5% CO₂, 99% humidity. The culture medium was changed every second day.

2.1.2 Mouse myoblasts C2C12

C2C12 cells were cultured in DMEM medium (Invitrogen, USA) supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (Invitrogen, USA), and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, USA) at 37°C, 5% CO₂, 99% humidity.

The culture medium was changed every two days. When the cells reached a monolayer, the culture was passed. Cells were detached from the bottom of the culture dish with a 2.5x trypsin solution (Invitrogen, USA) diluted in phosphate buffer. Cells were incubated with trypsin in a thermostat for 3-5 min. Next, the cells were centrifuged at 300 g for 5 min, the supernatant was removed and resuspended in the culture medium, breaking up the cell aggregates.

To freezing C2C12 the cell suspension was centrifuged at 300 g for 5 min, the supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in a 10% DMSO in FBS. The cell suspension was transferred into cryovials and frozen at -80°C. The next day, the cryovials were transferred to liquid nitrogen (-195°C).

2.1.3 Interstitial cells of the human aortic valve (IC)

IC were isolated from healthy aortic valves obtained from patients after aortic valve replacement surgery. For this, the valve was treated with a 0.2% collagenase solution (collagenase A-type IV, ≥ 160 U/mg, Worthington Biochemical Corporation, USA), as described previously (Kostina et al., 2018). IC were cultured in a growth medium containing DMEM (Invitrogen, USA) supplemented with 15% FBS, 2 mM L-glutamine, and 100 U/ml penicillin-treptomycin (Invitrogen, USA).

2.1.4 Human aortic smooth muscle cells (SMC)

SMCs were isolated by enzymatic treatment of the aortic wall. The aorta was placed in a collagenase solution according to the protocol described previously (Kostina et al., 2018). Aortic tissue was treated with 0.1% collagenase solution (collagenase, type III, ≥ 100 U/mg, Worthington Biochemical Corporation, USA) for 1 hour at 37°C. Further, after washing in DMEM medium with the addition of 20% FBS and an antibiotic, the aortic tissue was crushed into small fragments and transferred to a culture flask with scratches preliminarily applied to the bottom. Cells were cultured in DMEM medium (Invitrogen, USA) supplemented with 20% FBS (Invitrogen, USA), 2 mM L-glutamine, and 100 U/ml penicillin-treptomycin (Invitrogen, USA).

2.1.5 Human umbilical vein endothelial cells (EC)

EC were obtained from the umbilical vein by tissue enzymatic treatment (Baudin et al., 2007). The vein was washed in PBS, filled with a 0.1% collagenase solution (collagenase II, Worthington Biochemical Corporation, USA) and incubated in PBS at 37°C for 10 min. The collagenase solution containing the cell suspension was centrifuged at 300 g for 5 min. The cell pellet was washed with DMEM, resuspended, and plated on a plate coated with 0.2% gelatin (Sigma-Aldrich, USA) in ECM endothelial medium (Sciencell, USA). All cultures were maintained at 37°C, 5% CO₂.

2.1.6 Human mesenchymal cardiac cells (CMC)

2.1.6.1 Isolation, cultivation, and transduction of CMC

According to the protocol (Smits et al., 2009), a fragment of myocardial tissue obtained during heart surgery was washed in PBS from residual blood, dissected onto small clamps and digested with collagenase II (Worthington) solution (1 mg/mL) for 2 h at 37 °C. Then, the cell suspension was passed through a 40 µm strainer and centrifuged for 5 min at 300 g. The pellet was resuspended in growth medium (20% ECM (Stem cell), 70% DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, USA), 10% FBS (Hyclone) (Thermo Fisher Scientific, USA), 1x MEM NEAA amino acid solution, 1% L -glutamine (Invitrogen, USA), 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, USA)), and seeded onto a 0.1% gelatin-coated plate. The cells were maintained in growth medium at 37°C and 5% CO₂. The growth medium was changed every three days. When the cells reached a monolayer, the culture was passed. For this, the culture medium was removed and the cells were washed with PBS. Cells were detached from the bottom of the culture dish using a 2.5x trypsin solution (Invitrogen, USA) in PBS. Cells were incubated with trypsin at 37°C for 3–5 min. Then, to inhibit trypsin, a warmed growth medium was added and carefully resuspended, breaking cell aggregates. The cell suspension was transferred into 15 ml centrifuge tubes and centrifuged at 300 g for 5 min. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in fresh growth medium. For experiments, cells were seeded on 12-well plates in density 60x10³ cells per well.

Concentrate of lentiviral particles was added to the culture medium after CMC were seeded in 12 well plate. The culture medium was changed 16 hours after transduction.

The CMCs' immunophenotype was verified with a flow cytometer (GuavaEasyCyte6, Millipore) using CD33, CD45, CD117, CD90, CD105, CD73, CD146, and CD56 monoclonal antibodies (Becton Dickson) according to manufacturer's recommendations.

2.1.6.2 Differentiation of the CMC in the adipogenic and osteogenic directions

The induction of osteogenic or adipogenic differentiations were performed by replacing the growth medium with a differentiation medium.

Compound of the medium for adipogenic differentiation: growth medium (described above) containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 1 µM insulin, 0.2 mM indomethacin, and 0.5 mM rosiglitazone (Sigma, USA). The differentiation medium was changed every three days. The duration of adipogenic differentiation is 14 days.

Compound of the medium for osteogenic differentiation: growth medium containing 50 µM ascorbic acid, 1 µM dexamethasone, and 10 mM beta-glycerol phosphate (Sigma, USA) was used. The medium was also changed every three days. The duration of differentiation is 21 days.

2.1.6.3 Staining of CMCs differentiated in the adipogenic direction

Differentiated cells were stained with OilRed (Sigma, USA). To do this, the medium was removed from the culture dish and the cells were washed with PBS. Next, the cell layer was fixed with a 4% PFA solution for 30 min at room temperature, followed by washing with PBS. OilRed dye was added to the well with cells and incubated for 30 min. The cells were washed twice with water and a small amount of water was left to prevent the cells from drying out.

The staining results were analyzed using an Axiovert inverted microscope (Zeiss, Germany). MosaiX software (Carl Zeiss Microsystems, Germany) was used to determine the number of differentiated cells per well for each of the conditions.

2.1.7 Induced pluripotent stem cells (iPSC)

iPSC line with *LMNA* R249Q was generated from the patient's PBMCs using CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, USA). Additionally, two control wild type lines were used: AD3 and WTSI004-A.

AD3 line was kindly given by Dr. Neganova (Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia). AD3 line was generated from human neonatal fibroblasts (HNFs) using the lentiviral, nonintegrating CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. HNFs were purchased from Lonza (Slough, UK) and were cultured as described (Neganova et al., 2017). Generated AD3 iPSC line was characterized according to the protocol published before (Chichagova et al., 2015) and fulfilled all criteria of pluripotency (Neganova et al., 2017, 2016).

WTSI004-A line was obtained from European Bank for Induced pluripotent Stem Cells (EBiSC) (<https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/66540074>). The EBiSC Bank acknowledges Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) as the source of the hiPSC line WTSI004-A (HPSI1113i-qolg_3), which was generated with support from EFPIA companies and the European Union (IMI-JU').

2.1.7.1 Generation and cultivation of the iPSC

iPSC line carrying the *LMNA* R249Q mutation was generated from a patient with a previously verified diagnosis of Emery-Dreyfus myodystrophy (EDMD) and clinically significant arrhythmias by reprogramming patient-specific T-lymphocytes. For this, peripheral blood T-lymphocytes were expanded by culturing the blood mononuclear fraction overnight in RPMI1640 Glutamax medium supplemented with 10% FBS, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 200 units IL-2, and Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 magnetic particles (all Thermo Fisher Scientific, USA). Next, magnetic separation of T-lymphocytes was carried out using a magnetic stand. To induce reprogramming, T lymphocytes were

transduced with Sendai viruses carrying reprogramming factors (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Thermo Fisher Scientific, USA). Reprogramming was performed on a mouse embryonic fibroblast (MEF) scaffold in hES medium (KO-DMEM, 20% KOSR, 1% NEAA MEM amino acids, 2 mM glutamine, 50 IU/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin, 55 µM β-mercaptoethanol, 10 ng/ml of recombinant human bFGF) for 3-5 weeks before the formation of iPSC colonies. Distinct iPSC colonies with classical iPSC morphology were separated with a plastic tip into the wells of a 6-well plate pre-seeded with MEF at a rate of 250,000 cells per well. Thus, one original iPSC colony was transferred to one well, thereby isolating the colonies.

iPSC colonies were manually picked and transferred in Essential 8 medium (Thermo Fisher Scientific, USA) on Geltrex-coated plates. When the cells reached 80–90% confluency, they were passaged onto fresh Geltrex-coated plates using ReLeSR (Stem Cell Technologies, Canada) into Essential 8 medium containing 5 µM Rock kinase inhibitor Y-27632 (Tocris, UK). The medium was changed daily and cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.1.7.2 Testing the ability of iPSC to trilineage differentiation

To confirm the pluripotent potential of the generated iPSC line, the ability for the formation of three germ layers was tested. iPSCs were differentiated using the STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (Stem Cell Technologies, Canada) according to the manufacturer's recommendation. Cells were seeded on 24-well Geltrex-coated plates in Essential 8 medium supplemented with 5 µM of the ROCK inhibitor Y-27632. After 24 hours, the growth medium was changed to the appropriate differentiation medium; the medium was changed every two days. Then, on the 5th day for the meso- and endoderm, and on the 7th day for the ectoderm, immunocytochemical staining was performed for markers specific for the three germ layers.

2.1.7.3 Cardiogenic differentiation of the iPSCs

Differentiation of iPSCs towards cardiomyocytes was performed by modulating Wnt signaling activity with small molecules according to a previously published protocol (Burrige et al., 2014; Lian et al., 2013) with some modifications.

For plating for differentiation, iPSCs were detached from the plate using the TrypLe Select reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), the cell suspension was centrifuged at 300 g for 5 min. The supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in the Essential 8 culture medium (Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with 5 µM of the ROCK inhibitor Y-27632 (Tocris, Canada). The cells were plated on Geltrex-coated 12-well plates at a density of 600,000 cells per well. After 24 hours, Essential 8 medium were replaced for fresh. 24 hours after changing the Essential 8 medium, differentiation was started

by replacing the growth medium (Essential 8) with the differentiation medium (RPMI1640 Glutamax, supplemented with B27 without insulin, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (all Thermo Fisher Scientific, USA), and 6 µM CHIR99021 (Selleckchem, USA)) and left for two days. After that, the cells were maintained for 48 hours in RPMI1640 Glutamax medium supplemented with B27 without insulin and 5µM IWR-1 (Stem Cell Technologies, Canada). Then the medium was changed to RPMI1640 Glutamax supplemented with B27 without insulin with 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA). From 6 to 21-23 days of differentiation, cells were differentiated in RPMI1640 Glutamax medium supplemented with B27 with insulin, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA). The medium was changed every 2-3 days. Metabolic selection of cardiomyocytes was performed on days 9-13 of differentiation. To do this, the cells were transferred to a selection medium (DMEM without glucose and pyruvate (Thermo Fisher Scientific, USA), 4 mM sodium lactate (Sigma Aldrich, USA), 2 mM glutamine, 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA)). During selection, the death of undifferentiated cells and the survival of cardiomyocytes were observed.

Obtained cardiomyocytes were detached from the plates using the TrypLe Select reagent in RPMI1640 Glutamax medium supplemented with B27 and planted on Geltrex-coated slides (all Thermo Fisher Scientific, USA) for further electrophysiological studies.

2.2 Plasmids

To create lentivirus production, a plasmid system based on the pLVTHM plasmid, kindly provided by D. Trono (Ecole Polytechnique, Lausanne, Switzerland), was used. We used viruses carrying genes encoding the following proteins: Notch1 intracellular domain (NICD), wild-type lamin (*LMNA* WT), lamin with R482L substitution (*LMNA* R482L), lamin with R527C substitution (*LMNA* R527C). Plasmids were previously constructed in the Laboratory of Molecular Cardiology of the Almazov National Medical Research Centre (Saint-Petersburg, Russia) (Malashicheva et al., 2015, 2007).

2.3 Production of lentiviruses

The method is based on a protocol developed in the laboratory of Dr. D. Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland) and modified in the laboratory of A. N. Tomilin (Malashicheva et al., 2007).

2.4 Immunofluorescence staining

Cells were fixed on glass slides with 4% paraformaldehyde solution for 12 min at room temperature. The cells were permeabilized with a 0.5% solution of Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature.

Then the cells were washed with PBS three times for 5 min. Nonspecific binding was blocked with a 1% BSA solution in PBS for 30 min at room temperature, after which the solution was removed. Incubation with primary antibodies was carried out in a humid chamber for one hour at room temperature. The working solution of antibodies was prepared in 1% BSA solution in PBS. After three washes for 5 min in PBS, the cells were incubated with secondary antibodies conjugated with fluorochrome for an hour in the dark at room temperature, followed by washing in PBS three times for 5 min. The nuclei were additionally stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (Invitrogen, USA) for 1 min. Then the cells were washed twice in PBS. Glasses were mounted using Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma, USA). Immunocytochemistry results were visualized and analyzed using a Zeiss AxioObserver Z1 fluorescent microscope with an AxioCam 506 camera using Zen software (Zeiss, Germany). Primary and secondary antibodies used in the work are shown in the Table 1.

	Antibodies	Dilution	Company № (Cat #)/RRID
Pluripotent marker (primary antibodies)	Goat anti-OCT4	1:200	Santa Cruz Cat# 9656, RRID:AB_653551
Pluripotent marker (primary antibodies)	Mouse anti-NANOG	1:200	Millipore Cat# MABD24, RRID:AB_11203826
Pluripotent marker (primary antibodies)	Mouse anti-SSEA4	1:200	R&D Systems Cat# MAB1435, RRID:AB_357704
Ectodermal marker (primary antibodies)	Mouse anti - β III Tubulin	1:200	R&D Systems Cat# MAB1195, RRID:AB_357520
Mesodermal marker (primary antibodies)	Goat anti-Brachyury	1:200	R&D Systems Cat# AF2085, RRID:AB_2200235
Endodermal marker (primary antibodies)	Goat anti-GATA6	1:200	R&D Systems Cat# AF1700 RRID:AB_2108901
Cardiac-specific marker (primary antibodies)	Mouse anti-troponin T	1:200	Thermo Fisher Scientific Cat# MA5-12960, RRID:AB_11000742
Cardiac-specific marker (primary antibodies)	Mouse Anti- Tropomyosin	1:200	Santa Cruz, Cat# sc-74480
Myogenic marker (primary antibodies)	Mouse anti-desmin	1:200	Clone D33, DAKO M0760
Myogenic marker (primary antibodies)	Mouse anti- Myosin Heavy Chain (MYHC)	1:200	R&D Systems Cat# MAB4470- SP
Nuclear lamin A/C (primary antibodies)	Mouse-Lamin A/C Monoclonal	1:200	Invitrogen, Cat # MA3-1000

Secondary antibodies	AF546	1:1000	Invitrogen
Secondary antibodies	AF488 Goat Anti-Mouse IgG	1:1000	Invitrogen Cat# A11029, RRID:AB_138404
Secondary antibodies	AF488 Donkey Anti-Goat IgG	1:1000	Invitrogen Cat# A11029, RRID:AB_2534102

Table 1. Antibodies used in immunofluorescence analysis.

2.5 Gene expression analysis

Gene expression studies were performed using qPCR assay. Total RNA was isolated from cells with Extract RNA reagent (Evrogen, Russia) and was subsequently treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA). Reverse transcription reaction was performed using MMLV RT kit (Evrogen, Russia). QPCR measurement was conducted using the qPCR mix-HS SYBR+LowROX (Evrogen, Russia) with gene-specific primers on an LC480 platform (Roche, Switzerland). The relative expression of target genes was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with the *GADPH* used as the reference gene. The concentration and purity of the obtained samples (the ratio of absorption peaks 260 nm/280 nm - purity from proteins and amino acids; 260 nm/ 230 nm - purity from salts and phenols) were determined using a Nanodrop 7500 spectrophotometer (Wilmington, USA). In addition, the quality of the isolated RNA was checked by electrophoresis in 1% agarose gel at a current of 80 mA using electrophoretic chambers from BioRad (USA). The primer sequences used are listed in Table 2.

Gene	Sequence of forward/reverse primer (5'-3')	
Primer sequence for human genes		
<i>GAPDH</i>	AATGAAGGGGTCATTGATGG/AAGGTGAAGGTCGGAGTC AA	Reference gene
<i>HEY1</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG/CGAAATCCCAAACCTCCGAT A	Target genes for Notch pathway
<i>HES1</i>	AGCACAGAAAGTCATCAAAG/AGGTGCTTCACTGTCATTT C	
<i>NOTCH1</i>	GTCAACGCCGTAGATGACC/ TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG	
<i>NOTCH3</i>	GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT/GGCAAAGTGGTCCA ACAGCAGC	
<i>NOTCH4</i>	GTTGTGACAGGGTTGGGACT/CAGCCCAGTGGGTATCTCT G	
<i>SLUG</i>	TCCAGACCCTGGTTGCTTCA/GAATGGGTCTGCAGATGAG CC	

<i>C-MYC</i>	TTTCGGGTAGTGGAAAACCA/CACCGAGTCGTAGTCGAG GT	
<i>CCND3</i>	TGACCATCGAAAACTGTGC/TTGAGCTTCCCTAGGACCA G	
<i>DLL4</i>	AGGCCTGTTTTGTGACCAAG/CTCCAGCTCACAGTCCACA C	
<i>JAG1</i>	TGCCAAGTGCCAGGAAGT/GCCCCATCTGGTATCACACT	
<i>AP2</i>	GCCAGGAATTTGACGAAGTC/TGGTTGATTTCCATCCCAT	
<i>PPARG</i>	AGCCTTCCAACCTCCCTCATGGCA/TCCGGAAGAAACCCTT GCATCCT	Adipogenic markers
<i>RUNX2</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG/CGAAATCCCAACTCCGATA	
<i>ATF4</i>	HS00909569_g1 (TaqMan)	
<i>OPN</i>	TCACCTGTGCCATACCAGTAAA/TGGGTATTTGTTGTAAA GCTGCTT	
<i>COL1A1</i>	GACCTAAAGGTGCTGCTGGAG/CTTGTTACCTCTCTCGC CA	Osteogenic markers
<i>OGN</i>	GGCAATAACACCATTACCTCCC/AGGGTGGTACAGCATCA ATGT	
<i>BMP4</i>	AGCACTGGTCTTGAGTATCCTG/GCAGAGTTTTCACTGGT CCC	
<i>OCT3/4</i>	GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA/CTTCTGCTTCAGGAGCTT GG	
<i>NANOG</i>	CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC/TGGAAGGTTCCAG TCGGGTTCAACC	Pluripotent markers
<i>SOX2</i>	AACCCCAAGATGCACAACCTC/GCTTAGCCTCGTCGATGAA C	
<i>TBXT</i>	GGGTACTCCCAATCCTATTCTGAC/GCTGGACCAATTGTCA TGGG	
<i>ISL1</i>	GCGGAGTGTAATCAGTATTTGGA/GCATTGATCCCGTACA ACCT	Cardiac-specific markers
<i>GATA4</i>	CGACACCCCAATCTCGATATG/GTTGCACAGATAGTGACC CGT	
<i>MEF2C</i>	CCAACCTTCGAGATGCCAGTCT/GTCGATGTGTTACACCAG GAG	

<i>TrT</i>	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT/GCGGGTCTTGGAGACTTTC T	
<i>MYH7</i>	TAGACACACTTGAGTAGCCCAG/CTAGCCGCTCCTTCTCT GACT	
<i>ACTN2</i>	GAACAAGATGGAGGAGATTGCC/GATGTTGTGCTCATACT GCTTCA	
<i>FLNC</i>	GACAACCATGACTACTCCTACACT/CCGCCATAAGTCACT GTCACT	
<i>DMPK</i>	GAGACCTATGGCAAGATCGTCC/CTGAATGAAGTCTCGAG CCTCC	
<i>ILK1</i>	CCAAGATCAAGTGGCAGAGGAC/GTCCACAGGCATCTCT CCATAC	
<i>SCN5A</i>	GAGCGGCTGTGAAGATTCTGGTTC/GCCATGAACACGCAG TTGGTG	
<i>SCN4B</i>	GGCTCCTCCTTCTGTCTTAAGAG/CTGAGAGAAGCTGCAT GATCCA	
<i>TRPM4</i>	CTGCACGACGTTTCATAGTTGAC/TGTGTGCATCGCTGTCC C	
<i>HCN4</i>	CGCTGCCACCACTTCTGT/TTCAGGTGCCTTGGCGTC	
<i>PKP2</i>	GCTGCTTCCGTCCTTCTGTA/GGAGTGGTAGGCTTTGGCA	
<i>DSP</i>	GGCACCAGCAGGATGTACTA/CTCCTGGATGGTGTCTGG T	
<i>GJA5</i>	GCCAGTACTTCATCTACGGAATCT/GGATACGTAACAGTTG ACCGG	
<i>JUP</i>	ACTCTGTGCGTCTCAACTATGG/AAGCCGATGGTTGCCTT GAC	
Primer sequence for mouse genes		
<i>Myomaker</i>	CCTGTGATGGGCCTGGTTTGTC/GGTTTCATCAAAGTCGGC CAGTGC	
<i>Pax3</i>	CGATGGCATCCTGAGTGAGC/GCCGTGAAGGTGGTTCTGC	
<i>Myf5</i>	AAGGCTCCTGTATCCCCTCAC/TGACCTTCTTCAGGCGTCT AC	Myogenic markers
<i>MyoD</i>	CTGCCTTCTACGCACCTGGAC/GGGCCGCTGTAATCCATC ATGC	

<i>MyoG</i>	GAGACATCCCCCTATTTCTACCA/GCTCAGTCCGCTCATAG CC	
<i>Myh4</i>	GGCTGAGGAGGCTGAGGAAC/CTGGGACTCCGCGATGTC AG	
<i>Mrf4</i>	CAGTGGCCAAGTGTTCGGATCA/CTTCTCCACCACCTCC TCCAC	
<i>GAPDH</i>	GGATCTGACGTGCCGCCTG/GAAGGTGGAAGAGTGGGAG TTGC	Reference gene

Table 2. Primer sequences used for qPCR.

2.6 qPCR data analysis

The GraphPad program was used for statistical data processing and plotting; the plots were created using the Microsoft Excel program. The resulted data are presented as the mean value of all experiments performed, standard deviations (SD), or errors of the mean (SEM) are indicated for each analyzed sample. The significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered significant at a significance level of $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

2.7 RT-PCR

To confirm the elimination of exogenous reprogramming transgene factors in the generated iPSC line RT-PCR analysis with primers specific to Sendai vectors' sequences (*KOS*, *SeV*) or *GADPH* gene. Components of the PCR reaction: 50 ng of the cDNA template obtained after the reverse transcription reaction, 1 μ l of forward and reverse primers (10 pM), 2 μ l of dNTP mixture (10 mM), 5x DreamTaq Green buffer (Thermo Fisher Scientific, USA), 5 units. Taq polymerase (Silex). Primer sequences are shown in Table 3. Amplification was carried out according to the following scheme: 95°C - 30 s, then 35 cycles (95°C - 30 s, Tm - 30 s, 72°C - 1 min) and 72°C - 10 min. PCR was performed in a DNA amplifier (Applied Biosystems, USA). Electrophoresis of amplified DNA fragments was performed in 1% agarose gel on TAE buffer at a current of 80 mA.

	Gene	Forward/Reverse primer (5'-3')
Sendai virus transgenes	<i>KOS</i>	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ACCTTGACAATCCTGAT GTGG
Sendai virus genome	<i>SeV</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGAGTTTAAG AGATATGTATC
Reference gene	<i>GAPDH</i>	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG/GTCCACCACCCTGTTGC TGTAG

Table 3. Primer sequences used for RT-PCR

2.8 Alkaline phosphatase staining

For the pluripotency confirmation, iPSCs were stained using the sensitive substrate for alkaline phosphatase detection NBT/BCIP (Roche, Switzerland) solution according to the manufacturer's instructions. The results of staining were visualized using an AxioObserver D1 microscope (Carl Zeiss, Germany).

2.9 Promoter activity assay

To assess the activity of the Notch signaling pathway, a lentiviral vector based on the luciferase reporter construct 12XCSL was used. In the construct, the expression of the firefly luciferase gene is regulated by 12 CSL binding sites upstream of a minimal TK promoter and the level of CSL promoter activity indicates the transcriptional activation of a Notch pathway.

The cells were seeded on 12-well plates and transduced simultaneously with: 1) lentivirus containing the 12xCSL-luc reporter; 2) lentivirus containing the NICD gene; 3) lentivirus containing the LMNA (wild type or mutant). Samples with cells without transduction with a luciferase reporter construct and/or without the addition of luciferin were used as controls. Cells were lysed using Luciferase Assay System (Promega, USA) according to the manufacturer's recommendations 48 hours after transduction. Luciferase activity was measured with Synergy2 (BioTek, USA). Samples were normalized by protein content using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.10 Sodium current recording

Experiments on recording the incoming sodium current (I_{Na}) were performed using the patch-clamp method in a whole-cell lead. Intracellular solution for recording I_{Na} (mmol/l): 130 CsCl, 10NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.3 CsOH). When registering I_{Na} , 20 μ M nifedipine was also added to the solution to block calcium currents. Extracellular solution for recording I_{Na} (mmol/l): 140 NaCl, 1MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucose (pH 7.4 CsOH).

Glass microelectrodes were fabricated using a puller (P-1000, Sutter Instrument, USA). The resistance of the electrodes was 1.8-3.2 mOhm. Data acquisition and correction of liquid junction potentials were performed using an Axopatch 200B amplifier and Clampfit software version 10.3 (Molecular Devices Corporation, USA). The currents were obtained at a stimulation frequency of 20-50 kHz and filtered to 5 kHz using an analog-to-digital converter (Digidata 1440A acquisition system, Molecular Devices Corporation, USA). Series resistance was compensated at 75-80%. To avoid possible fluctuations in the kinetics of stationary activation and inactivation, all protocols were recorded for at least 5-10 min after switching to the whole-cell configuration.

2.11 Data analysis

To obtain current-voltage characteristics of sodium current (I/V), the following protocol was used: cell depolarization pulses from a maintained potential of -100 mV to a voltage between -80 and 40 mV over 20 ms in 5 mV steps. The current density (pA/pF) was obtained by normalizing the I_{Na} amplitude to the cell capacitance. The reversion potential was calculated by linear extrapolation of peak currents at depolarization potentials from 10 to 40 mV. The activation versus voltage dependence is the dependence of the normalized conductance (proportion of activated channels) on the membrane potential and is calculated from the I/V protocol. Stationary activation is estimated using the Boltzmann function $G/G_{max} = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$, where G_{max} is the maximum conductivity for sodium, $V_{1/2}$ is the potential at which 50% of the channels are activated and k is the slope constant.

A number of additional protocols were also used to identify such characteristics of mutant channels as stationary inactivation, stationary fast inactivation and stationary slow inactivation. Stationary inactivation was obtained using the following protocol: a membrane maintenance potential of -100mV, a 500ms prepulse varying in voltage from -120 to 0mV in 5mV steps followed by -20mV depolarization (test pulse). Stationary fast inactivation was measured using the following protocol. Cells were held at a potential of -100 mV and then hyper- and depolarized for 20 ms to voltages between -120 and 0 mV in 5 mV steps, and then depolarized for 20 ms at a voltage that produced the maximum I/V response. protocol. The parameters of the stationary inactivation and stationary fast inactivation curves were determined from the Boltzmann equation $I/I_{max} = 1/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k))$, where I_{max} is the maximum sodium current , $V_{1/2}$ is the potential at which 50% of the channels are inactivated and k is the slope constant.

Stationary slow inactivation was measured using a 10 s prepulse at a voltage ranging from -120 to 0 mV in 5 mV steps followed by hyperpolarization to -120 mV for 100 ms to remove fast inactivation and a 20 ms test pulse that elicits the maximum response in I/V protocol.

3 RESULTS AND DISCUSSIONS

In our study, we used a spectrum of tissue-specific point mutations in the *LMNA* gene associated with a particular disease phenotype. Thus, based on the introduction of the mutant lamin A/C gene into cells via lentivirus, we modeled the disease phenotype on the varied cells.

3.1 Investigation of the *LMNA* mutations' effect on muscle differentiation

Mouse C2C12 myoblasts and mouse primary satellite cells were used as cellular models for muscle differentiation. These cell models are shown to express the main markers of muscle differentiation and are able to fuse to form myotubes.

3.1.1 Effect of the G232E and R571S mutations in the *LMNA* gene on myotube formation

To modify the genome, C2C12 cells and mouse primary satellite cells were transduced with a concentrate of lentiviral particles (5 MOI) carrying different forms of human lamin: wild-type lamin (*LMNA* WT) and mutant forms (*LMNA* G232E and *LMNA* R571S).

A comparative analysis of the effectiveness of cell infection with different forms of lamin was carried out. To do this, we perform immunocytochemical staining of myotubes using antibodies that recognize human lamin A/C (green color in Figure 10, A). To visualize myotubes, cells were stained with antibodies recognizing mouse myosin heavy chains (red in Figure 10, A). An analysis of the efficiency of cell transduction with endogenous forms of *LMNA* showed no significant differences when different forms of *LMNA* (*LMNA* WT/*LMNA* G232E/*LMNA* R571S) were used. The percentage of nuclei visualized after immunocytochemical staining for human lamin A/C for different forms of lamin was as follows: for *LMNA* WT - 30.57% (n analyzed myotubes = 105), in the case of *LMNA* G232E - 29.93% (n = 99), and in the case of *LMNA* R571S - 46.93% (n=100) (Figure 10, A). In addition, no visible abnormalities in the nuclear morphology were found.

To assess the effect of mutant forms of lamin on the process of muscle differentiation (formation of myotubules), mouse satellite cells were used, which were transduced with lentivirus carrying *LMNA* G232E or *LMNA* R571S. Satellite cells transduced with lentivirus carrying *LMNA* WT were used as controls. The transduced cells were differentiated for 7 days in a low serum medium. The morphology of myotubes expressing exogenous forms of lamin was assessed by immunocytochemical staining for desmin and myosin heavy chains (Figure 10, B). As a control, myotubes generated from satellite cells with *LMNA* WT and from non-transduced satellite cells were used. It was found that the mutant myotubes are characterized by a shorter length compared to the control. It has also been shown that mutations lead to the formation of myotubes with an impaired process of nuclear distribution.

In order to quantify the results obtained after immunocytochemical staining of the mutant and control

myotubes, the lengths of the myotubes (the number of nuclei incorporated into the myotube) were calculated (Figure 10, C). Control myotube lengths (carrying *LMNA* WT/non-transduced) contain more than 15 nuclei in 65-70% of cases. However, myotubes carrying *LMNA* R571S contained 5-10 nuclei in 60% of cases; and myotubes with *LMNA* G232E contained only 1-2 nuclei.

There are two mechanisms explaining why cells carrying a mutation form myotubes with a disturbing process of muscle differentiation: 1) a violation of division in cells due to mutations; 2) a violation of the fusion process. To assess the process of cell fusion, the fusion index was calculated (fusion index = (N nuclei incorporated into myotubes/N of all nuclei) \times 100%) (Figure 10, D). Fusion indices for control myotubes were $47.99 \pm 0.45\%$ (for *LMNA* WT) and $46.97 \pm 1.49\%$ (for non-transduced cells). At the same time, fusion indices in mutant myotubes were lower, $17.98 \pm 1.83\%$ (for *LMNA* R571S) and $12.42 \pm 4.24\%$ (for *LMNA* G232E). Data on myotube lengths and fusion indices complemented each other, cells with the lowest fusion index had the shortest length. In contrast, cells with an increased fusion index were able to form long tubes.

Moreover, “abnormal” myotubes were found, cells with impaired the process of positioning the nuclei (Figure 10, E). The number of such abnormal myotubes was calculated for all forms of lamin: for *LMNA* G232E - $61.65 \pm 6.23\%$ of the total number of myotubes, for *LMNA* R571S - $64.68 \pm 4.62\%$, for the endogenous form of lamin and *LMNA* WT - $6.94 \pm 2.16\%$ (Figure 10, E). Thus, our data indicate that mutations in the *LMNA* gene are associated with a violation of the divergence of nuclei to the poles during the formation of myotubes (Perepelina et al., 2017).

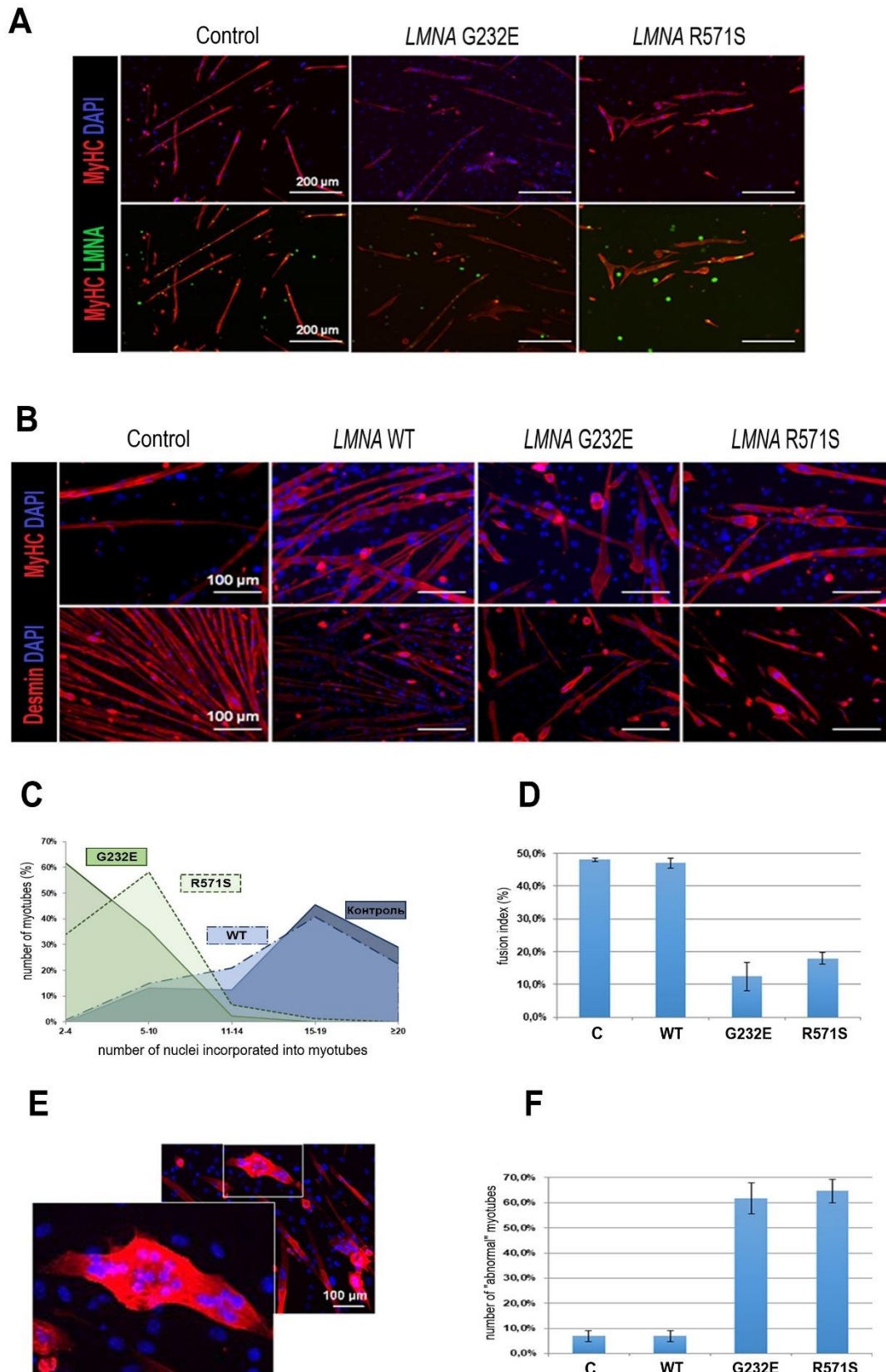


Figure 10. Morphological characteristics of myotubes carrying transgenic forms of lamin A/C (*LMNA*). (A) Immunocytochemical staining of myotubes formed by mouse satellite cells bearing different forms of lamin. Myosin heavy chains (MyHC, red). Nuclei are stained with DAPI (blue) and anti-human lamin A/C antibodies (green). (B) Immunocytochemical staining of myotubes formed by mouse satellite cells bearing different forms of lamin. Staining for desmin (Desmin) and myosin heavy chains (MyHC) (red). Nuclei are stained with DAPI

(blue).

(C) Percentage of myotube lengths expressing different forms of lamin. Myotubes expressing endogenous lamin (n=120 myotubes) and *LMNA* WT (n=120 myotubes) contain 15-19 nuclei. Myotubes with *LMNA* R571S (n=74 myotubes) contain 5-10 nuclei, and myotubes with *LMNA* G232E (n=62 myotubes) contain 2-4 nuclei.

(D) Fusion index of myotubes bearing different forms of lamin. Data are presented as means \pm SD (n analyzed myotubes: C (control)=120, *LMNA* WT=120, *LMNA* G232E=62, *LMNA* R571S=74).

(E) An example of an "abnormal" myotube. Stained for desmin (red). Nuclei are stained with DAPI (blue).

(F) Number of "abnormal" myotubes bearing different forms of lamin. Data are presented as means \pm SD (n analyzed myotubes: C (control)=120, *LMNA* WT=120, *LMNA* G232E=62, *LMNA* R571S=74) (Perepelina et al., 2017).

3.1.2 Impact of the G232E and R571L *LMNA* mutations on the expression of the myogenic markers

Next, we analyzed changes in the expression of myogenic markers in C2C12 cells due to *LMNA* G232E and *LMNA* R571S mutations during muscle differentiation. For this, we used the real-time PCR method, evaluating the expression of the following genes: *Pax3*, *Myf5*, *Myomaker*, *MyoD*, *MyoG*, *Myh4*, *Mrf4* (Figure 11). C2C12 cells transduced with lentivirus carrying *LMNA* WT/*LMNA* G232E/*LMNA* R571S were differentiated within 24 hours, 72 hours, and 7 days.

The gene expression analysis result showed alterations in the expression levels of some genes caused by the action of the mutations. The *LMNA* G232E mutation resulted in a statistically significant decrease of the *Myomaker* gene expression 24 hours and 7 days after differentiation induction compared to cells transduced with *LMNA* WT. *LMNA* R571S caused a decreased level of the *Myomaker* on the 7th day of differentiation.

Also, it was shown that mutations caused an increase in the expression of *Myf5* and *MyoD* in cells at an early stage of differentiation (24 hours). At a later stage of muscle differentiation (7 days), a decrease in the expression level of *MyoG* and *Mrf4* was observed under the influence of the *LMNA* G232E mutation compared to *LMNA* WT (Perepelina et al., 2017).

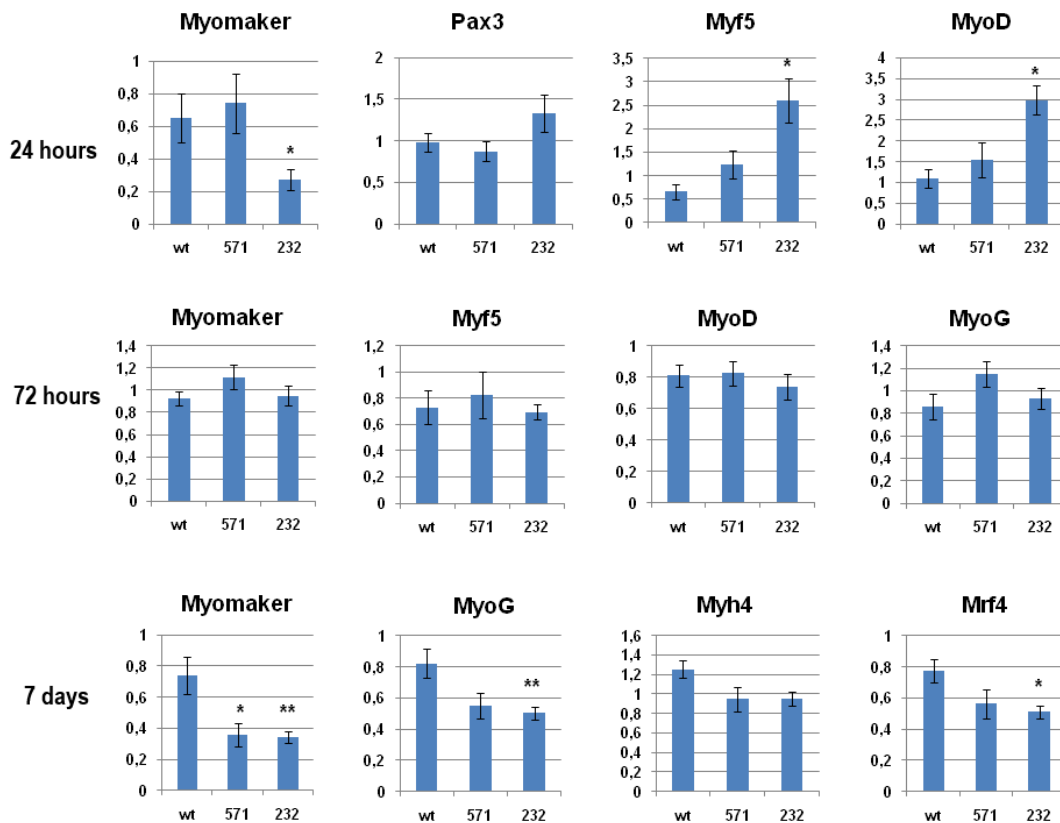


Figure 11. Evaluation of the effect of the *LMNA* R571S and *LMNA* G232E on the expression of myogenic markers during muscle differentiation of C2C12 cells. The OY axis indicates the relative amount of mRNA for each gene measured by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and normalized to the *LMNA* WT sample. Data are presented as means of 4-6 biological replicates \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; wt—*LMNA* WT; 571 - *LMNA* R571S; 232-*LMNA* G232E (Perepelina et al., 2017).

3.1.3 Discussion of the results obtained in the study of the *LMNA* mutations effect on the C2C12 cells and mouse satellite cell muscle differentiation

We evaluated the effect of the *LMNA* mutations leading to the development of Emery-Dreyfus muscular dystrophy (*LMNA* G232E – leads to the affection of the skeletal muscles) and dilated cardiomyopathy (*LMNA* R571S – leads to the affection of the cardiac tissue), on the process of muscle differentiation. We have shown that the analyzed mutations lead to a disruption in the process of muscle differentiation – disruption of cell fusion and the formation of myotubes. Myotubes expressing mutant forms of lamin were characterized by a lower number of nuclei compared to myotubes expressing exogenous wild-type lamin and endogenous form of lamin. We found that the formation of short myotubes was associated with a decrease in the fusion index. In addition, mutant cells often formed "abnormal" myotubes (nuclei were concentrated in the middle of myotubes) (Cadot et al., 2012; Yin et al., 2013). Thus, the differentiation process was disrupted not only at the early stages of myoblast fusion but also at later stages, when the myotube was already formed.

Our results on the assessment of the lamin gene mutations' effect on myotube morphology confirm and supplement the available literature data. One of the early works was performed on a culture of C2C12

cells that expressed *LMNA* R453W, the first described lamin mutation in an EDMD patient. Cells containing this mutation had a reduced ability to differentiate. Analysis of the expression of myogenic markers revealed a reduced level of the *MyoG*, while the expression of the earlier *MyoD* marker remained unchanged (Favreau et al., 2004a). Another study performed on the same cell line (C2C12) and analyzing the same mutation (R453W) also revealed a decrease in *MyoG* expression (Håkelién et al., 2008). It has been shown that the effect of lamin gene mutations on *MyoD* and *MyoG* expression is associated with the involvement of lamin A/C in the regulation of Rb/E2F and Rb/MyoD signaling pathways (Pekovic et al., 2007).

In experiments conducted on satellite cells obtained from *Lmna* gene knockout mice, it was shown that myoblasts demonstrated a reduced proliferation rate rather than a reduced fusion index, as in our work (Cohen et al., 2013). This discrepancy with our results can be explained by different cellular models used in the works. It is possible that compensatory mechanisms are activated in cells completely devoid of lamin, which are not present when the mutant form is expressed.

Our data on the expression of the *Myf5* gene (an increased level of expression 24 hours after the induction of differentiation under the action of the *LMNA* G232E) were consistent with the results of experiments performed on primary myoblasts of *Lmna* gene knockout mice. In the absence of lamin in the cells, the expression of the *Myf5* transcription factor was increased, while the *Pax3/Pax7* satellite cell markers did not change their expression level (Frock et al., 2006). Moreover, there are works devoted to analysis of biopsy material obtained from patients with a *LMNA* mutation. The satellite cells of these patients also had a reduced level of *MyoD* level, but the number of cells expressing *Pax7* was increased (Park et al., 2009). This is consistent with our results on *Pax3* gene expression.

Thus, *LMNA* mutations associated with the striated-muscle phenotype development lead to a reduced ability of myoblasts to form myotubes, as well as increased expression of early myogenesis markers and reduced expression of late myogenesis markers. However, the results could vary depending on the analyzed material, the method of modification of the lamin gene, and the duration of cell differentiation.

Also, in the present work, a decrease in *Myomaker* gene level was detected 24 hours after the induction of differentiation for *LMNA* G232E and 7 days after the induction of differentiation for both mutations. The reduced level of *Myomaker* expression may be associated with the reduced level of *MyoG* level. Up to date, it is not completely clear what transcription factors participate in the regulation of the *Myomaker* expression. Possibly, *MyoD* and *MyoG* factors involve in the regulation of the *Myomaker* activity, since the *Myomaker* gene has a sequence in its promoter for binding to transcription factors of the “helix-loop-helix” type, which are *MyoD* and *MyoG* (Millay et al., 2014). Thus, reduced *MyoG* expression may lead to reduced *Myomaker* expression.

The fact that under the action of the mutation affecting striated-muscle, *LMNA* G232E, *Myomaker* expression decreases already 24 hours after the induction of differentiation, is consistent with the data on the shorter length of myotubes formed during this mutation and the lowest cell fusion index.

Thus, the mutation leading to the development of the striated-muscle phenotype has the greatest negative effect on the ability of myoblasts to fuse and the expression of the key markers of muscle differentiation. This confirms the tissue-specific manner of the disease development (Perepelina et al., 2017).

3.2 Investigation of the *LMNA* mutations' impact on adipogenic differentiation

Human cardiac mesenchymal cells (CMCs) were used as a cell model to study the effect of a tissue-specific mutation in the *LMNA* gene (R482L) on adipogenic differentiation. CMCs were shown to be able to differentiate into adipocytes (Malashicheva et al. 2015), which confirms the validity of using these cells as a model for studying the mechanisms of disease development in which adipogenesis is affected.

3.2.1 Evaluation of cell transduction efficiency and nuclear morphology

Firstly, the cellular genome was modified by transduction with lentiviral constructs carrying the wild-type human lamin gene (*LMNA* WT) or mutant forms (*LMNA* R482L or *LMNA* R527C). To assess the efficiency of cell transduction, rat CMCs were used to visualize the expression of human lamin A/C. Expression of exogenous forms of lamin was confirmed by immunocytochemical staining with antibodies specifically recognizing human lamin A/C. Non-transduced human CMCs were used as a positive control (Figure 12).

We noted changes in nuclear morphology ("blebbing" of the nuclear membrane) in cells transduced with lentivirus carrying *LMNA* R482L. In contrast, control (non-transduced) cells and cells transduced with *LMNA* WT had no changes in nuclear morphology (Perepelina et al., 2018).

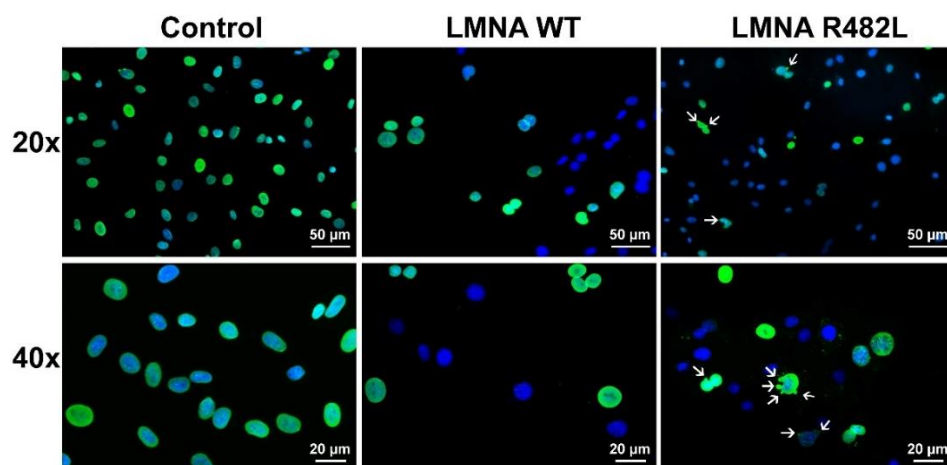


Figure 12. Analysis of the expression of transgenic forms of lamin A/C in rat CMC. Immunocytochemical staining of rat heart stem cells for human lamin A/C (green), nuclei were additionally stained with DAPI (blue). Control – non-transduced human CMC (Perepelina et al., 2018).

3.2.2 Evaluation of the *LMNA* R482L impact on the Notch pathway activity in the undifferentiated cells

All further experiments were performed using human CMCs. To explore the *LMNA* mutation effect on Notch pathway activity we measured the expression level of the Notch-related genes in human CMCs. We transduced CMCs with lentiviruses carrying *LMNA* WT or *LMNA* R482L and activated Notch signaling via transduction of the cells with Notch-intracellular domain (NICD). We analyzed the expression of following genes: *HEY1*, *SLUG*, *CMYC* (c-Myc), and *CCND3* (cyclin D3). The introduction of NICD led to a significant increase in *HEY1* expression, which is a consequence of the activation of the Notch signaling pathway. *LMNA* R482L led to a significant decreased level of *HEY1*, *SLUG*, *CMYC*, and *CCND3* compared to *LMNA* WT (Figure 13). Thus, mutant lamin A/C counteracts the activation of the Notch pathway in undifferentiated CMCs (Perepelina et al., 2018).

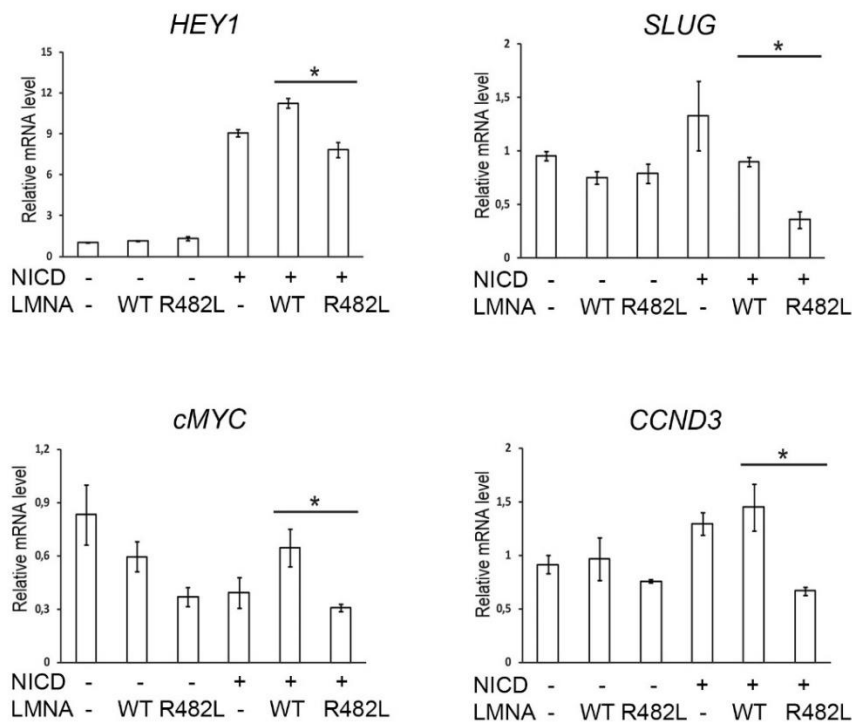


Figure 13. *LMNA* R482L in cooperation with Notch activation lead to alterations in expression of the Notch target gene in CMC. Relative mRNA level was measured by qPCR. The results are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, (n = 3) (Perepelina et al., 2018).

3.2.3 Evaluation of the *LMNA* R482L effect on adipogenic differentiation under conditions of Notch activation

We demonstrated that CMCs capable to differentiate toward adipocytes (Figure 14). Staining with oil red O dye (on day 14) and qPCR (on day 3) on adipogenic markers (*AP2* and *PPRG*) were carried out. Undifferentiated CMCs were used as a negative control.

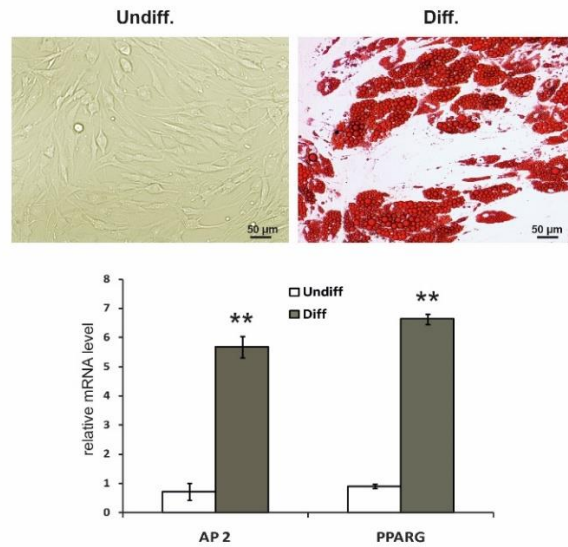


Figure 14. CMCs testing on ability to adipogenic differentiation. The upper panel shows undifferentiated (Undiff) and differentiated (Diff) cells stained with Oil Red dye. The lower panel shows the expression level of adipogenic markers *AP2* and *PPARG* measured by qPCR. The results are represented as mean \pm SD (n = 3); **p < 0.01 (Perepelina et al., 2018a).

To study the effect of mutant *LMNA* on expression of Notch target genes during adipogenic differentiation of the CMC, we transduced cells with lentiviruses carrying *LMNA* WT or *LMNA* R482L and activated Notch with NICD as described previously. Further, control (non-transduced) and transduced CMCs were induced to adipogenic differentiation. Figure 15 shows that Notch activation inhibits adipogenic differentiation, which was determined by counting the area of differentiated cells and analyzing *AP2* and *PPARG* expression (Figure 15, A, B). In the absence of Notch activation, *LMNA* R482L had no significant effect on the adipogenic differentiation of the CMC compared to *LMNA* WT. At the same time, upon Notch activation, *LMNA* R482L caused a statistically significant decrease in the number of differentiated cells, as well as a decrease in the expression of adipogenic markers *AP2* and *PPARG*. Thus, *LMNA* R482L inhibits the adipogenic differentiation of the CMC only under conditions of activation of the Notch signaling pathway (Perepelina et al., 2018).

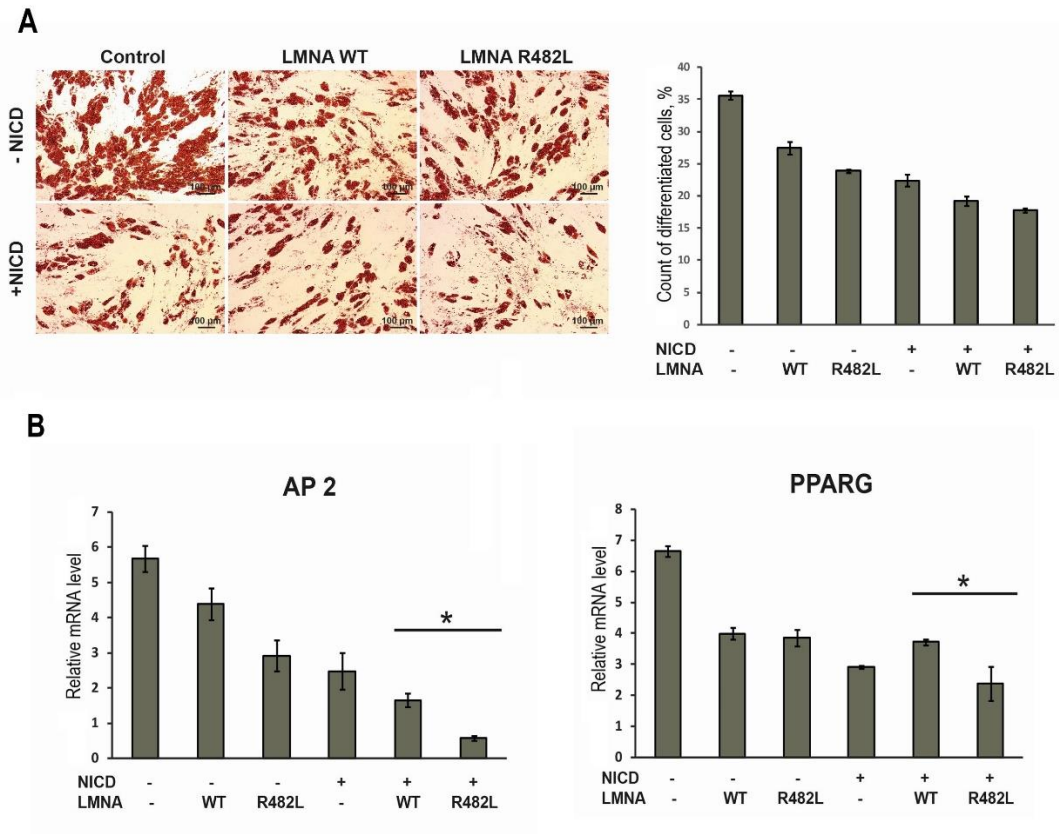


Figure 15. *LMNA* R482L leads to decrease adipogenic differentiation when Notch is activated. (A) Left panel: differentiated cells stained with oil red O dye. Right panel: percentage of oil red O positive cells for different conditions. (B) relative mRNA level of adipogenic markers *AP2* and *PPARG* measured by qPCR. The results are represented as mean \pm SD, (n = 3); *p < 0.05 (Perepelina et al., 2018).

3.2.4 Evaluation of the *LMNA* R482L effect on Notch signaling activity in differentiated CMCs

The aim of this stage of the work was to study the effect of the mutant lamin (*LMNA* R482L) on the Notch pathway activity during adipogenic differentiation. CMC's genome modification was performed by introducing *LMNA* WT or *LMNA* R482L via lentiviruses. The notch was activated by transduction with NICD. The activity of the Notch pathway was explored by measurement expression of Notch-related genes (*HEY1* and *NOTCH1*) by qPCR on day 3 of adipogenesis. We found inhibition Notch in the cells expressing mutant lamin A/C in the condition of the Notch activation compared to wild-type cells. Additionally, we used the reporter luciferase construct CSL-luc, the activity level of which reflects the activity of CSL-dependent transcription. The luciferase activity of the CSL-luc reporter confirms the results of qPCR (Figure 16) (Perepelina et al., 2018).

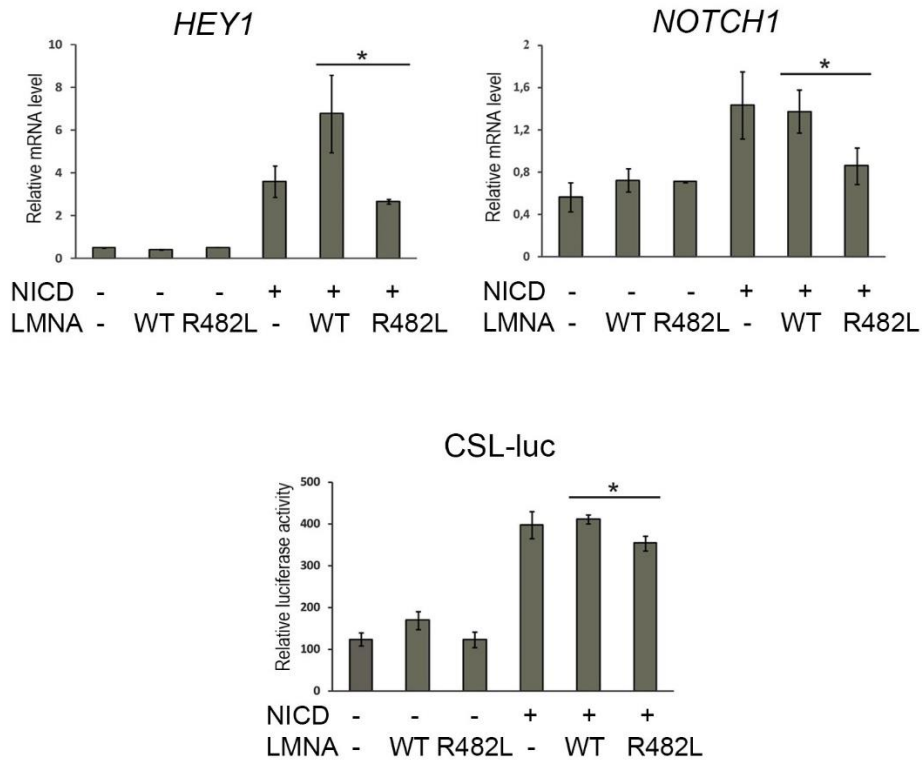


Figure 16. *LMNA* R482L leads to decrease Notch target gene expression in differentiated CMCs when Notch is activated. Relative mRNA level of *NOTCH1* and *HEY1* was measured by qPCR. Notch activity was additionally measured using luciferase CSL-luc reporter. The results are represented as mean \pm SD (n = 3); *p < 0.05 (Perepelina et al., 2018).

3.2.5 Discussion of the results obtained from the study of the *LMNA* R482L effect on the adipogenic differentiation and the functioning of the Notch signaling pathway

We showed that *LMNA* R482L caused morphological changes in the nucleus structure, manifested in the form of nuclear blebbing in the rat CMC. The structural anomalies in nuclear lamina caused by mutations in *LMNA* could contribute to the altered interaction between lamins and chromatin. Lamin A/C fail to functionally assemble in fibroblasts bearing R482L derived from a FPLD patient (Capanni et al., 2003).

At the level of gene expression, we showed that the introduction of the *LMNA* R482L into cells leads to a decrease in the expression of the Notch target genes: *HEY1*, *SLUG*, *C-MYC*, *CCND3* compared to *LMNA* WT in undifferentiated cells. The obtained data demonstrated that mutant forms of lamin have a negative effect on the functioning of the Notch pathway.

We also showed that *LMNA* R482L had a negative effect on the Notch pathway compared to wild-type lamin (*LMNA* WT) in presence additional activation of Notch. These results were obtained using real-time PCR for the *HEY1* gene and confirmed using a luciferase reporter construct.

According to our results, *LMNA* R482L mutation leads to a decrease in differentiation potential. The Notch pathway also had a negative effect on the process of adipogenic differentiation. The results of real-

time PCR showed that the simultaneous introduction of NICD and *LMNA* R482L leads to a significant decrease in the *AP2* and *PPARG* level compared to *LMNA* WT. Similar results were reflected earlier papers involving a mutant form of lamin leading to progeria (Meshorer and Gruenbaum, 2008; Scaffidi and Misteli, 2008). Lamin A/C overexpression has previously been reported to suppress adipogenic differentiation (Bermeo et al., 2015; Tilgner et al., 2009; Vadrot et al., 2014). Additionally, the *LMNA* R482W mutation has been shown to affect the regulatory activity of the SREBP1 protein, a transcription factor that regulates hundreds of genes involved in lipid metabolism and adipocyte differentiation (Vadrot et al., 2014). However, in our cellular model using mesenchymal cells of cardiac origin, we observed *LMNA* R482L-mediated inhibition of adipogenic differentiation only under conditions of Notch activation. Emerin (binding partner for lamin A/C) has been shown to directly interact with the Notch intracellular domain, thereby inhibiting Notch activity (Lee et al., 2017). In another study, the interaction of emerin with lamin A/C was shown to be impaired by *LMNA* R482L in cells from FLPD patients (Capanni et al., 2003). Our findings on Notch down-regulation by *LMNA* R482L in undifferentiated and differentiated cells are in agreement with these reports.

Thus, our data suggest that A-type lamins may interact with components of the Notch pathway. The details and outcomes of this interaction deserve further research to better understand the role of A-type lamins in cellular differentiation as well as the in pathology (Perepelina et al., 2018).

3.3 Study of the effect of tissue-specific mutations in the *LMNA* gene on the process of osteogenic differentiation of human mesenchymal cells

The aim of this stage of the work was to study the effect of tissue-specific *LMNA* mutations on osteogenic differentiation and activity of the Notch pathway in several cell types of mesenchymal origin. We selected two *LMNA* mutations associated with mandibuloacral dysplasia (MAD), a congenital disorder characterized by a severe impairment of the osteogenic differentiation process, *LMNA* R527C, and *LMNA* R471C, and compared the effect of these mutations on osteogenic differentiation and Notch activity in four types human cells of mesenchymal origin - umbilical vein endothelial cells (EC), cardiac mesenchymal cells (CMC), aortic valve smooth muscle cells (SMC) and aortic valve interstitial cells (IC).

3.3.1 Evaluation of cell transduction efficiency and nuclear morphology

We analyzed the morphology of nuclei in rat CMC transduced with lentiviruses containing the wild-type human lamin gene (*LMNA* WT) or the mutated lamin gene (*LMNA* R527C and *LMNA* R471C). Transduced and control (non-transduced human CMC) cells were stained with antibodies specifically recognizing human lamin A/C. Control (non-transduced) cells and cells transduced with *LMNA* WT characterized by no changes in nuclear morphology. In contrast, cells transduced with lentivirus carrying

LMNA R527C and *LMNA* R471C characterized by abnormalities in nuclear morphology ("blebbing" of the nuclear membrane) (Figure 17) (Perepelina et al., 2019).

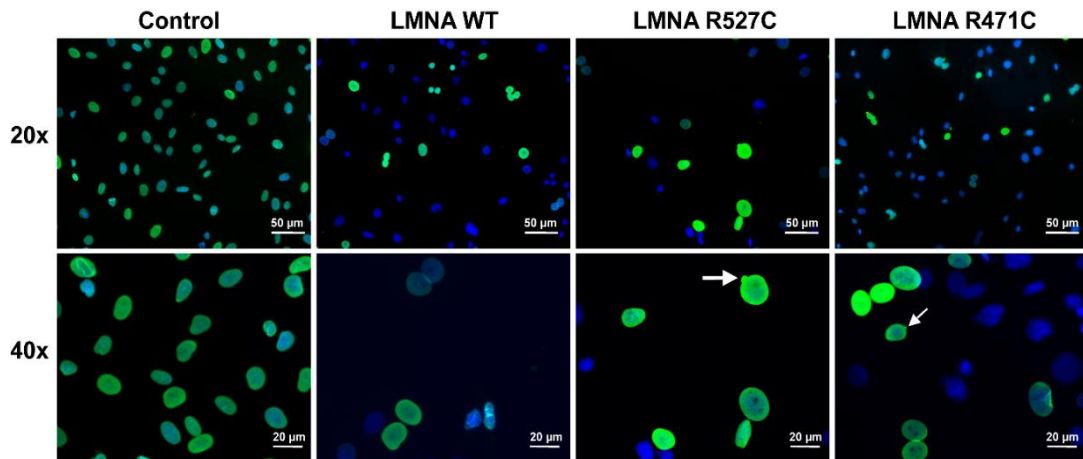


Figure 17. Lamin A/C visualization in rat CMCs carrying different forms of the *LMNA*. Control – human non-transduced CMC. The cells were stained with anti-lamin A/C antibodies recognizing human lamin A/C. *LMNA* R527C and *LMNA* R471C caused nuclear blebbing as a consequence of the mutations (Perepelina et al., 2019).

3.3.2 Evaluation of the *LMNA* R527C and *LMNA* R471C impact on the expression of osteogenic markers in human mesenchymal cells (EC, CMC, SMC, and IC).

To evaluate the ability of cells to osteogenic differentiation, we induced osteogenic differentiation in cells by adding specific factors to the culture medium. Comparison of expression levels of osteogenic markers (*RUNX2*, *ATF4*, *OPN*, and *COL1A1*) in undifferentiated cells and cells differentiated within 3 days was assessed using qPCR (Figure 19 - EC, 20 - CMC, 21 - SMC, 22 - IC, upper row). We observed a significant decrease in the expression level of the *RUNX2* gene in differentiated SMC, as well as of the *OPN* and *COL1A1* genes in differentiated IC compared to undifferentiated cells. However, we did not observe statistically significant changes in the levels of osteogenic markers in the differentiated CMC and EC.

Then we analyzed the impact of the mutant lamin A/C on the expression of the osteogenic markers in differentiating cells (Figure 19 - EC, 20 - CMC, 21 - SMC, 22 - IC, lower row). We transduced cells with lentiviruses carrying *LMNA* WT or a mutant form of *LMNA* (*LMNA* R527C and *LMNA* R471C) and induced osteogenic differentiation. Cells expressed *LMNA* R471C were characterized by significant alterations in the expression level of osteogenic markers: increased expression of the *RUNX2* and *ATF4* in the CMC; increased expression of the *ATF4* in SMC; increased expression of the *RUNX2* and a decreased level of the *ATF4* and *COL1A1* in IC. Mutation *LMNA* R527C led to a significant increase in the *RUNX2* expression in SMC and CI, as well as a decrease in the *COL1A1* expression in IC. Moreover, we noted a minor expression level of the *OPN* and *COL1A1* genes in EC, and *OPN* in the CMC. Taken together, we suggest

that *LMNA* mutation has a unique effect considering different cell types during osteogenesis (Perepelina et al., 2019).

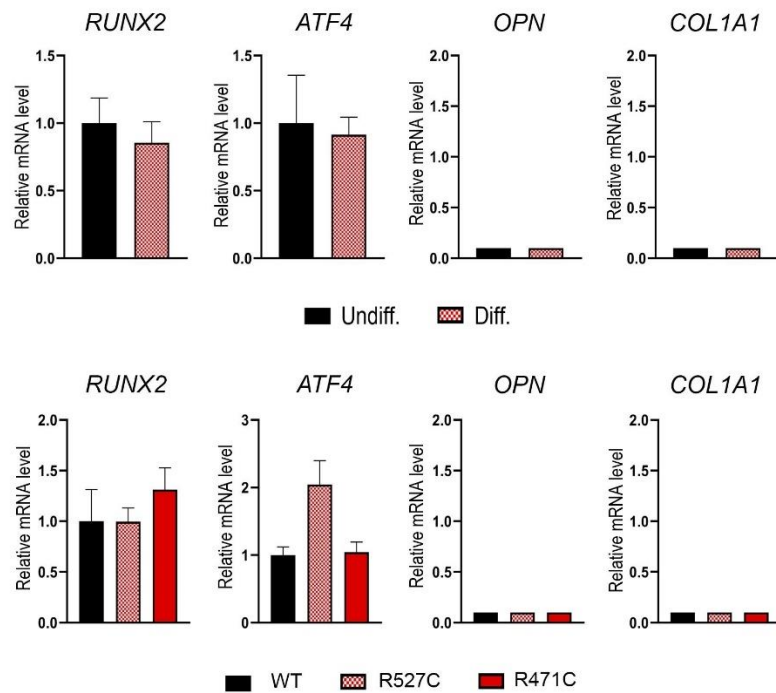


Figure 18. Changes in osteogenic expression profile of EC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. Upper panel shows expression level in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). Lower panel shows expression level in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD (Perepelina et al., 2019).

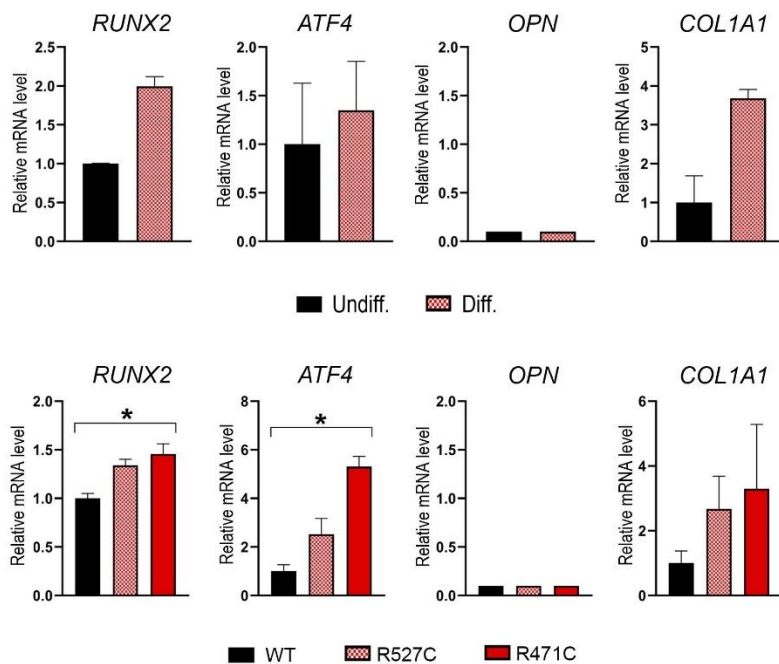


Figure 19. Changes in osteogenic expression profile of CMC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. Upper panel shows expression level in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). Lower panel shows expression level in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C

(R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

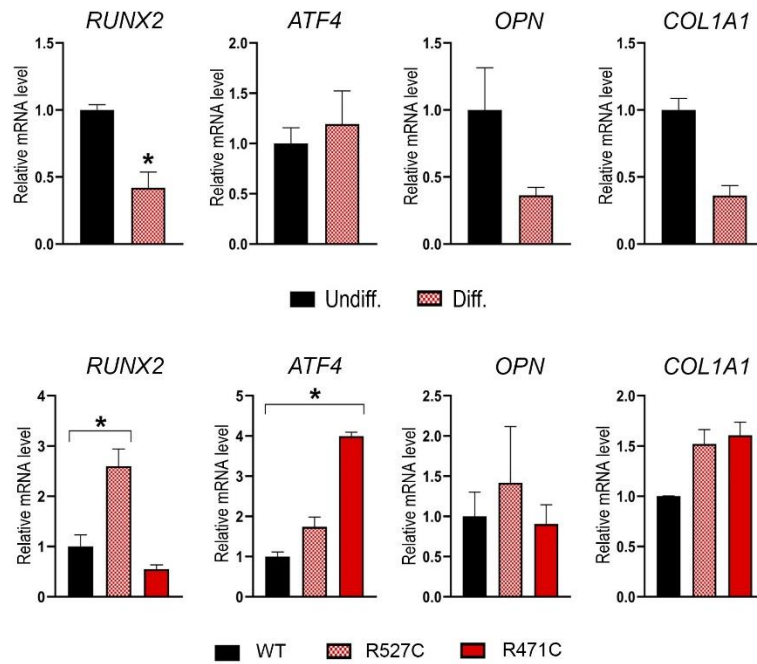


Figure 20. Changes in osteogenic expression profile of SMC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. Upper panel shows expression level in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). Lower panel shows expression level in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

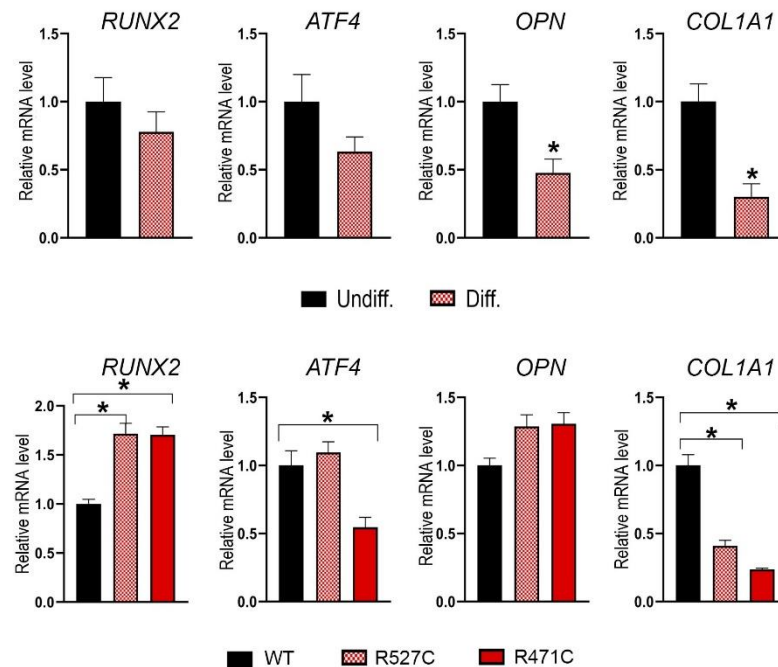


Figure 21. Changes in osteogenic expression profile of IC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. Upper panel shows expression level in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). Lower panel shows expression level in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

3.3.3 Evaluation of the *LMNA* R527C and *LMNA* R471C impact on the expression of Notch-related genes in human mesenchymal cells

To evaluate the interaction of lamin A/C with the Notch pathway, we analyzed the effect of *LMNA* mutations on the expression of Notch-related genes in four types of human mesenchymal cells: EC, CMC, SMC, and IC (Figure 23, 24, 25, 26 respectively). The osteogenic differentiation of non-transduced CMC led to a significant increased expression level of the *NOTCH1* and *NOTCH3* genes compared to undifferentiated cells (Figure 23, upper row). The induction of osteogenic differentiation of the IC led to a statistically significant decrease in the expression of the *NOTCH1*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *HEY1*, *HES1* (Figure 25, upper row) and a decrease in *HES1* for SMCs (Figure 24, upper row). No statistically significant effect was observed in EC (Figure 22, upper row).

At the next step, we assessed the effect of *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations on Notch target genes compared to *LMNA* WT. We found a significant increase in *NOTCH3* expression in the CMC caused by the *LMNA* R527C mutation compared to *LMNA* WT (Figure 23, lower row). SMCs carrying *LMNA* R471C showed a significant decrease in *NOTCH3* expression compared to *LMNA* WT (Figure 24, lower row). Additionally, we demonstrated statistically significant changes in gene expression levels in IC: a decrease in *NOTCH1* and *NOTCH3*, and an increase in *NOTCH4* expression in cells transduced with *LMNA* R471C; *LMNA* R527C resulted in an increase in *HES1* expression (Figure 25, lower row).

Our data suggest that mutant lamin A/C leads to impaired Notch signal transduction and confirms our previous observations that the effect of mutations in *LMNA* may be cell-type dependent (Perpelina et al., 2019).

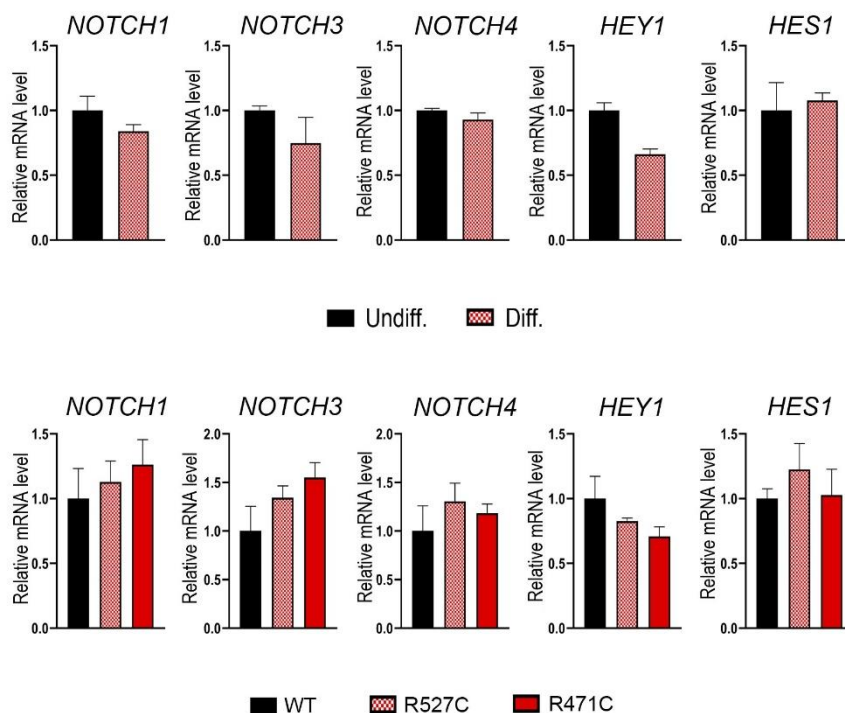


Figure 22. Changes in expression of Notch-dependent genes in EC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. The upper panel shows expression levels in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). The lower panel shows expression levels in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

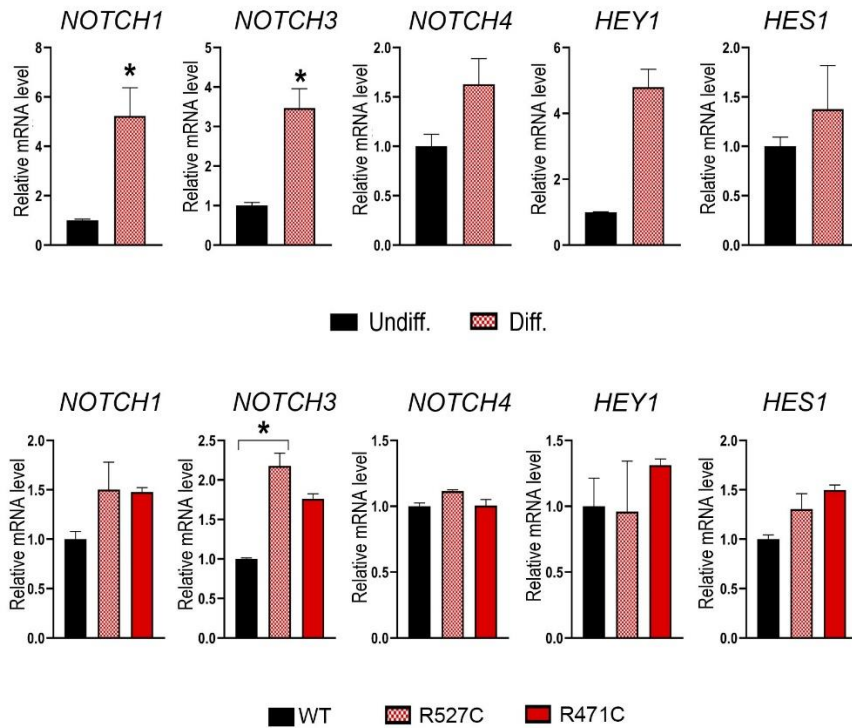


Figure 23. Changes in expression of Notch-dependent genes in CMC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. The upper panel shows expression levels in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). The lower panel shows expression levels in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

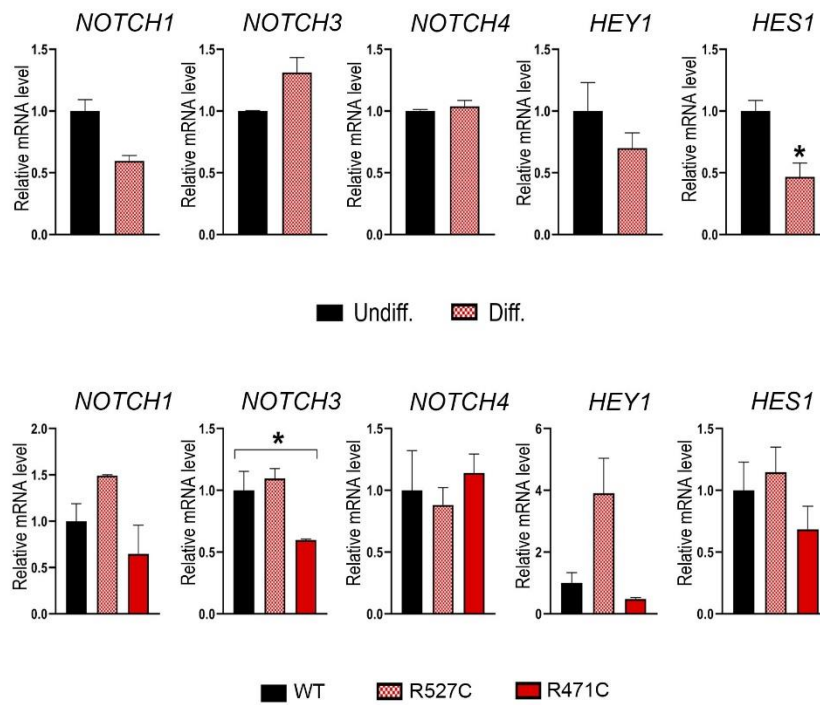


Figure 24. Changes in expression of Notch-dependent genes in SMC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. The upper panel shows expression levels in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). The lower panel shows expression levels in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

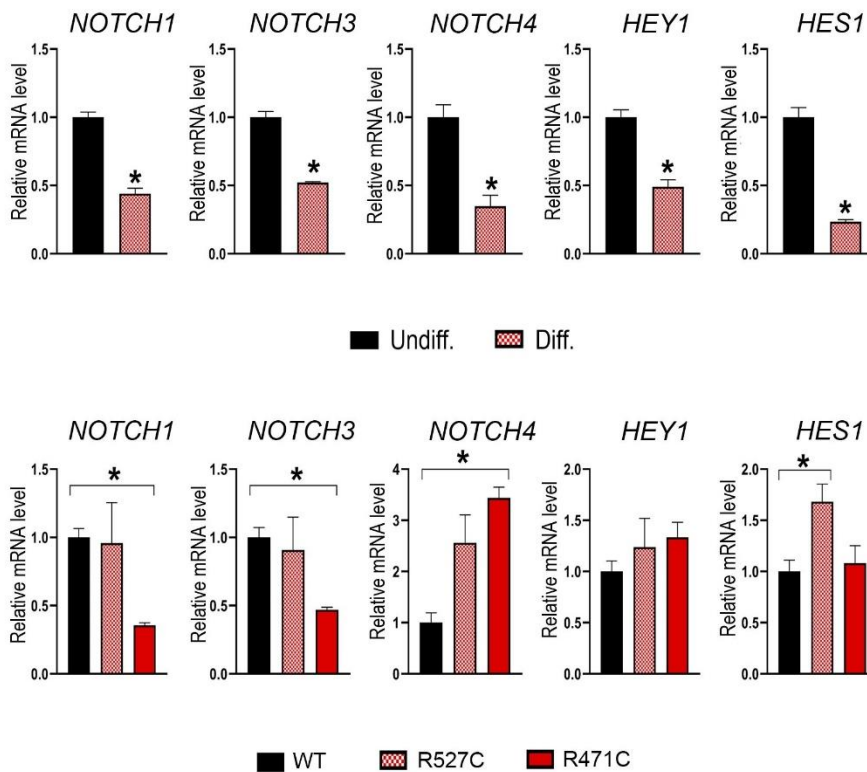


Figure 25. Changes in expression of Notch-dependent genes in IC caused by *LMNA* R527C and *LMNA* R471C mutations. Relative mRNA level was assessed by qPCR. The upper panel shows expression levels in undifferentiated cells (Undiff) and cells on day 3 of osteogenic differentiation (Diff). The lower panel

shows expression levels in differentiated cells carrying either *LMNA* WT (WT) or *LMNA* R527C/*LMNA* R471C (R527C/R471C). The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0,05$ (Perepelina et al., 2019).

3.3.4 Evaluation of the *LMNA* R527C effect on the CMC and IC osteogenic differentiation in the presence of Notch activation

Next, we explored the impact of *LMNA* R527C mutation on osteogenic phenotype of CMC and IC (as they had a stronger response under the influence of the *LMNA* R527C mutations) in the presence of Notch activation (3 and 12 days).

Firstly, we explored an effect of the mutation on the Notch activity. The introduction of NICD into CMC and IC caused upregulation of the *HEY1* (Figure 26-27, upper row, first graph) at 3 and 12 days of differentiation. Consequently, Notch was activated. The combined effect of the *LMNA* R527C mutation and Notch activation led to downregulation of the *HEY1* in CMCs compared to *LMNA* WT (Figure 26, upper row, second graph). Similarly, CSL luciferase reporter activity was reduced in CMC with *LMNA* R527C compared to *LMNA* WT when Notch was activated (Figure 26, upper row, third graph). At the same time, IC with *LMNA* R527C had an increased *HEY1* level compared to *LMNA* WT, in the condition of Notch activation (Figure 27, upper row, second graph).

The study of the *LMNA* R527C mutation effect on osteogenic differentiation of CMC and IC in presence of Notch activation, revealed inhibition of osteogenesis in the CMC, evaluated by the *RUNX2* expression (Figure 26, lower row, second graph). In contrast, the *LMNA* R527C mutation caused increased *RUNX2* expression in IC in the same conditions (Figure 27, lower row, second graph).

Thus, we observed an inhibitory effect of *LMNA* R527C on osteogenic differentiation in the CMC, while *LMNA* R527C induced activation of osteogenic differentiation in IC in presence of Notch activation (Perepelina et al., 2019).

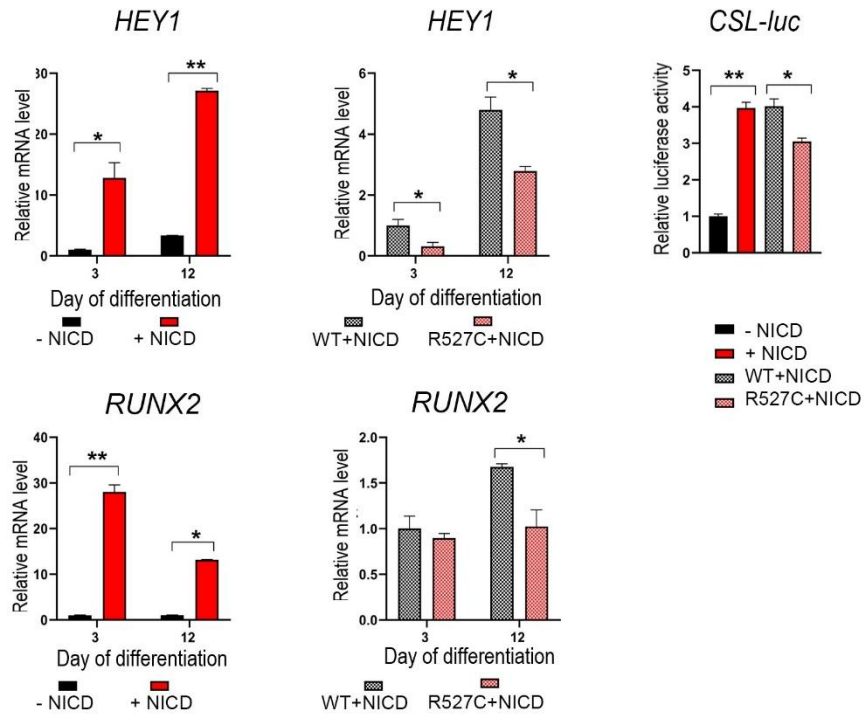


Figure 26. The *LMNA* R527C mutation causes a decrease of the *HEY1* (upper panel, second graph) and *RUNX2* (lower panel, second graph) expression in differentiated CMC when Notch is activated. Relative mRNA levels of *HEY1* and *RUNX2* were measured by qPCR. The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Additionally, Notch-dependent transcription was measured using luciferase CSL-luc reporter (upper panel, third graph) (Perepelina et al., 2019).

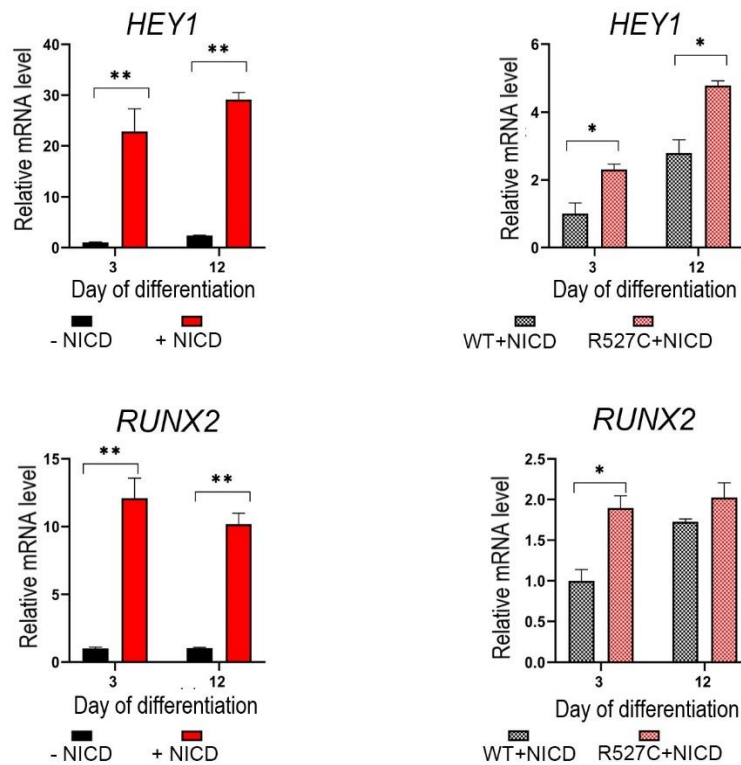


Figure 27. The *LMNA* R527C mutation causes an increase of the *HEY1* (upper panel, second graph) and *RUNX2* (lower panel, second graph) expression in differentiated CMC when Notch is activated. Relative mRNA levels of *HEY1* and *RUNX2* were measured by qPCR. The results are represented as mean \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Perepelina et al., 2019).

3.3.5 Analysis of osteogenic markers and Notch target genes expression in different lines of undifferentiated mesenchymal cells

We compared expression levels of Notch target genes and osteogenic markers in four undifferentiated lines (Figure 28). The results show that, despite a common mesenchymal origin, EC, CMC, SMC, and IC have very different levels of expression of the same gene. We suggest that this initial gene profile could also influence the effect of a given *LMNA* mutation in a given cell line (Perepelina et al., 2019).

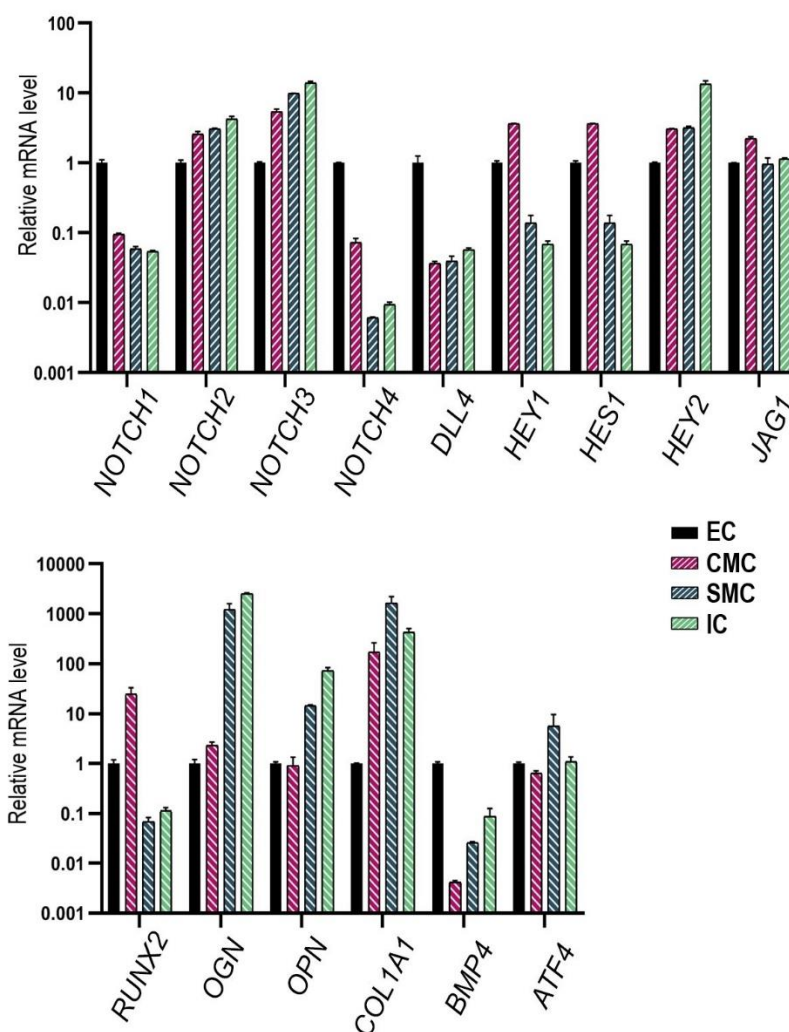


Figure 28. Variability of the expression levels of the Notch-dependent (upper graph) and osteogenic (lower graph) genes in four undifferentiated cell lines of mesenchymal origin. Relative mRNA level was assessed by qPCR. The results are represented as mean \pm SD (Perepelina et al., 2019).

3.3.6 Discussion of the results obtained in the study of the *LMNA* R527C and *LMNA* R471C effect on the process of osteogenic differentiation in cells of mesenchymal origin

In this section of the study, we obtained results on the effect of mutations associated with the development of the bone phenotype of laminopathy on the process of osteogenic differentiation of 4 cell

types of mesenchymal origin. We have shown that cells of similar origin (mesenchymal origin) may respond differently to the same mutation in the *LMNA* gene during osteogenic differentiation. Previously, it was shown in our laboratory in a human MSC model that *LMNA* mutations associated with various phenotypic manifestations of the disease have different effects on the process of MSC cell differentiation (Malashicheva et al., 2015).

We have shown that the effect of *LMNA* mutations on osteogenic differentiation may also depend on the Notch signaling pathway. The Notch pathway is one of the key regulators that ensure the development, differentiation, and maintenance of tissues in the adult organism (Andersson et al., 2011). Notch is known to be involved in the regulation of osteogenic differentiation (Zanotti and Canalis, 2016). The involvement of Notch in interaction with A-type lamins has been shown for progerin, a protein resulting from the deletion of the *LMNA* gene that leads to premature aging (Scaffidi and Misteli, 2008). Lamin A/C is shown to affect osteoblast differentiation (Tsukune et al., 2017) and may be a determining factor in the pathogenesis of both sarcopenia and osteopenia (Tong et al., 2011). Several studies have reported that progerin expression is associated with functional impairments in MSCs leading to premature osteogenic differentiation (Scaffidi and Misteli 2008; Blondel et al. 2014).

We observed different responses of four cell lines to the effect of mutations during osteogenic differentiation. Apparently, cells at an early stage of differentiation are particularly sensitive to disruption of the lamin filaments functioning, and different cell lines may respond differently to these changes. An increase or decrease in lamin A/C expression can lead to changes in gene expression and other regulatory processes in the cell (Piekarowicz et al., 2017).

There is evidence that disease-causing mutations in lamin A/C can radically alter lamin-chromatin interactions (Briand and Collas, 2020). For example, the *LMNA* R482W mutation associated with lipodystrophy has been shown to lead to a change in the spatial conformation of chromatin (Rønningen et al., 2015). These data indicate that lamin A/C is involved in the regulation of gene expression during development by restricting or accessing specific regions of DNA for promoter-enhancer interaction. All of these data suggest that lamin A/C mutations can specifically alter cell fate (Briand and Collas, 2020).

The results obtained in this study show that lamina A/C has a strictly tissue-specific effect under the same conditions on different types of human mesenchymal cells. We observed a broad range in expression levels of Notch signaling target genes and osteogenic markers between different cell types used in the study. We suggest that different levels of gene expression in different lines are the result of the spatial orientation of genomic regions that interact with lamina, which is unique for cells, and is a key factor determining cell fate. Comparison of the cell models used in the study allows us to come closer to understanding the regulatory role of A-type lamins, which determine the differentiation decisions of cells of different lines (Perepelina et al., 2019).

3.4 Study of the patient-specific *LMNA* mutation's effect on the cardiogenic differentiation of induced human pluripotent stem cells

The main approach of this part of the research work was to create a model of lamin-associated cardiomyopathy in order to study the mechanisms underlying the disturbance of cardiogenic differentiation caused by *LMNA* mutations. To model the process of cardiogenic differentiation, we used induced pluripotent stem cells (iPSCs) carrying a mutation in the *LMNA* gene (R249Q). Also, two iPSC lines generated from healthy donors were used as controls.

3.4.1 Generation and characterization of the iPSC line carrying R249Q *LMNA* mutation

iPSCs were generated by reprogramming patient-specific T-lymphocytes with CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's recommendations. Sendai viruses are RNA viruses that do not integrate their genetic material into the DNA of the cell, and are eliminated within a month after transduction. The usage of these viruses made it possible to avoid the uncontrolled insertion of transgenes into the cell genome and their subsequent effect on the differentiation ability of iPSCs.

Obtained iPSC colonies had the classic morphology of pluripotent stem cells, i.e. they formed round flat colonies with clear edges without signs of differentiation (Figure 29, A), and also showed a positive stain for alkaline phosphatase (Figure 29, B). Expression of transcription factors - the main regulators of pluripotency OCT3/4, NANOG, SOX2 - was confirmed by real-time PCR. RNA isolated from the C16 human embryonic cell line (EC) obtained at the Institute of Cytology RAS was used as a positive control for the expression of pluripotency genes (Figure 29, C). Furthermore, the obtained iPSCs demonstrated the nuclear localization of the transcription factors OCT3/4 and NANOG, and the presence of the surface marker SSEA4 (Figure 29, D). Flow cytometry analysis revealed high expression of human iPSC-specific surface marker SSEA4 (Figure 29, E).

Elimination of exogenous reprogramming factors in iPSCs was confirmed by RT-PCR with specific primers (Table 3). RNA isolated from PBMC transduced by Sendai viruses using the CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit was used as a positive control for the expression of transgenes (genes of the reprogramming set contained in the Sendai virus genome) (Figure 29, F). Genotyping by means of Sanger sequencing confirmed that generated iPSCs line retained the patient-specific heterozygous *LMNA* p.R249Q genetic variant (Figure 29, G). Molecular karyotyping demonstrated normal 46, XY karyotype (Figure 29, H). The analysis was performed using SurePrint G3 Human CGH Microarray 8x60K microarrays (Agilent Technologies) in accordance with the manufacturer's recommendations. The copy number of genome regions was analyzed using CytoGenomics Software v3.0.1.1 (Agilent Technologies, USA) with imported databases of copy numbers of human genome regions.

STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (Stem Cell Technologies, Canada) was used to assess the ability of iPSCs to differentiate into cells of three germ layers. Differentiated cells were stained using immunocytochemistry for ectoderm (β III tubulin), mesoderm (Brachyury), and endoderm (GATA6) markers (Figure 29, I) (Perepelina et al., 2020).

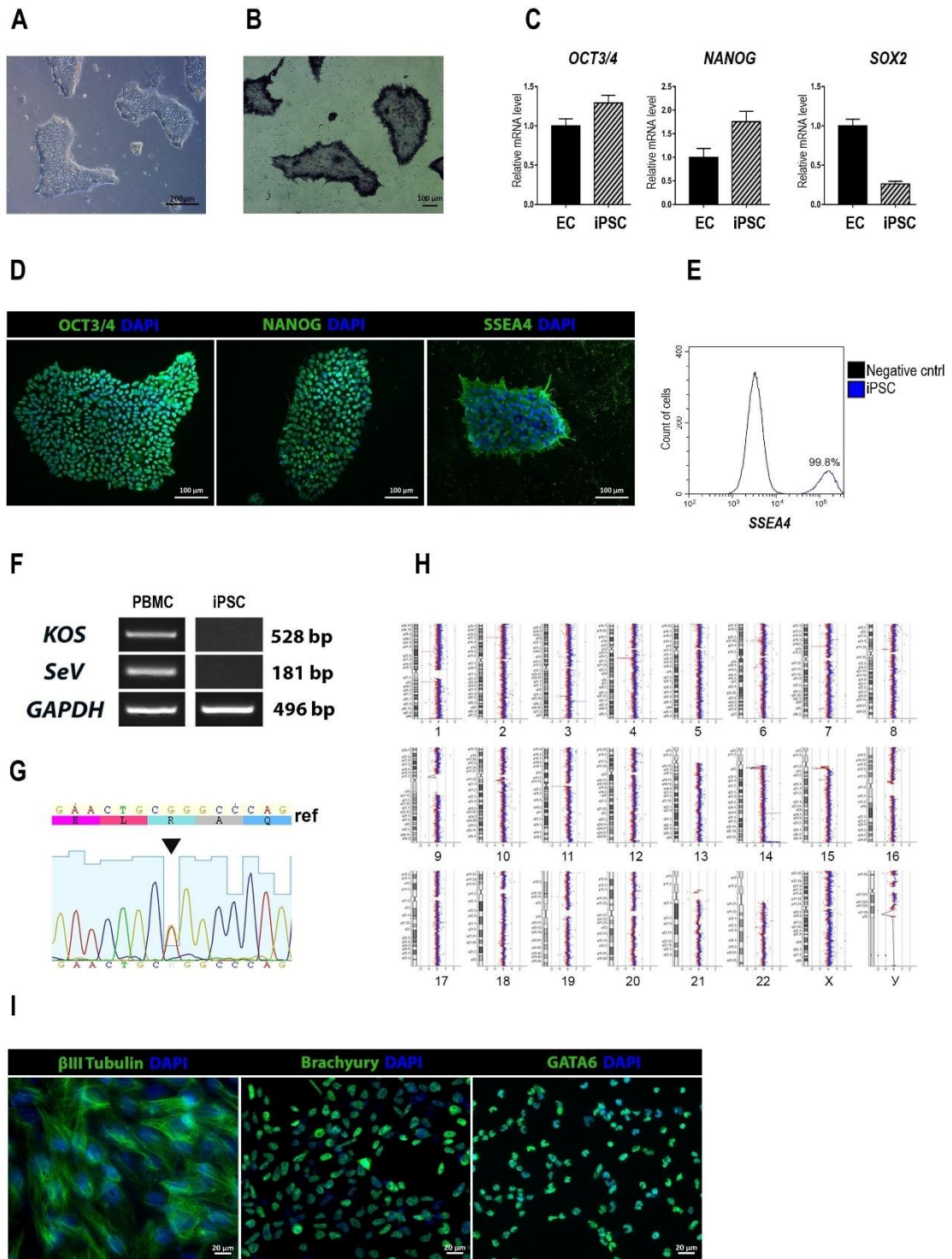


Figure 29. Characterization of the iPSC line carrying the R249Q mutation. (A) The appearance of the iPSC colony; (B) iPSC colonies stained for alkaline phosphatase; (C) Expression analysis of the pluripotency main markers by qPCR. ES - human embryonic stem cells. (D) Immunocytochemical staining of iPSCs for pluripotency markers. (E) Flow cytometry analysis revealing of surface antigen SSEA4. (F) Confirmation

of exogenous reprogramming factors elimination by RT-PCR. PBMC - peripheral blood mononuclear cells. (G) Verification for the presence of a patient-specific mutation in the *LMNA* gene by Sanger sequencing. (H) Verification of iPSC karyotype by chip-based molecular karyotyping. (I) Immunocytochemical staining of differentiated iPSCs for markers of three germ layers (β III tubulin - ectoderm, Brachyury - mesoderm, GATA6 - endoderm) (Perepelina et al., 2020).

3.4.2 Generation of the iPSC-based model of healthy CMs and *LMNA* R249Q CMs

Cardiogenic differentiation of iPSCs with *LMNA* R249Q and control iPSC lines was carried out according to a protocol based on modulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Lian et al., 2012) with minor modifications. This protocol of iPSC-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) generation includes 5 main stages are shown in Figure 30.

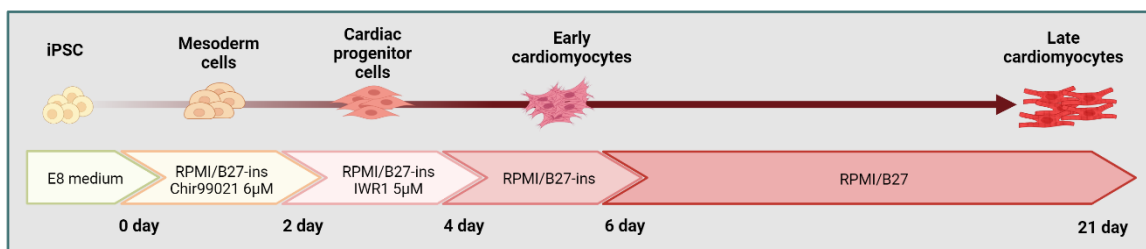


Figure 30. Scheme of the cardiogenic differentiation of the iPSCs (Perepelina et al., 2022).

First of all, we assessed the control iPSC lines and the line with a mutation in the *LMNA* gene for the ability to differentiate into cardiomyocytes. The duration of cardiogenic differentiation varied (0, 2, 5, 7, 14, 21 days) to observe the expression of cardiac-specific markers in dynamic.

Immunostaining of differentiating cardiomyocytes revealed increasing levels of troponin T and tropomyosin during the differentiation timeline (for control and *LMNA* R249Q). We noted earlier expression of troponin T protein in iPSC-CMs with *LMNA* R249Q compared with control (Figure 31). Any other changes related to structural abnormalities of iPSC-CMs carrying *LMNA* R249Q have not been observed.

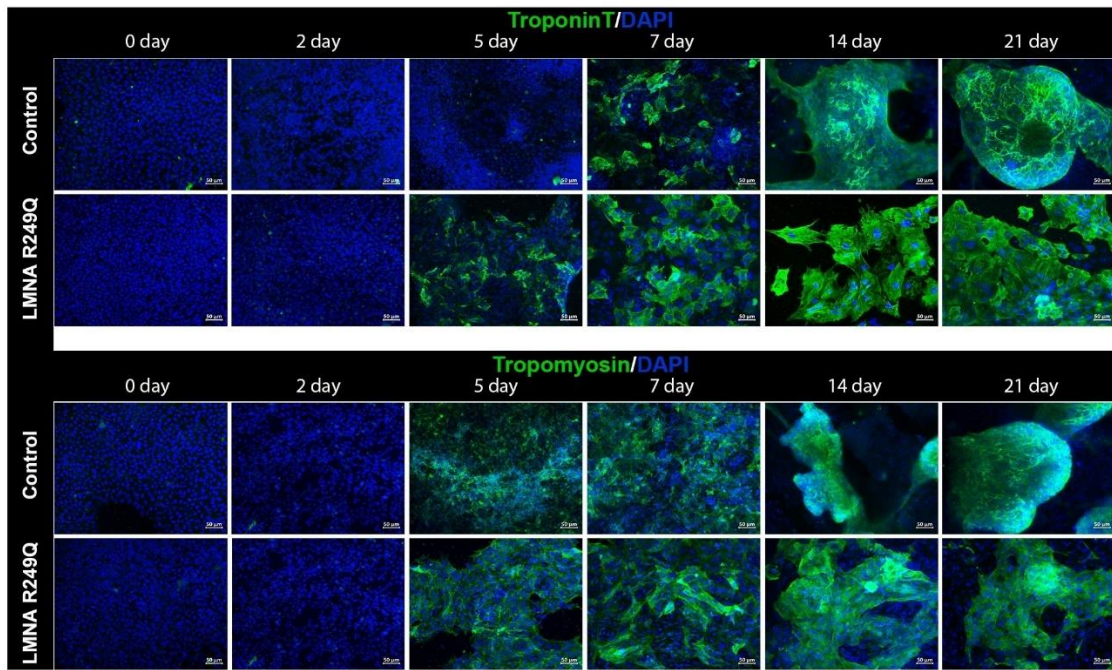


Figure 31. Immunofluorescence staining of iPSC (Control and *LMNA* R249Q) on a different stage of differentiation (0, 2, 5, 7, 14, 21 days) for cardiac-specific markers troponin T, and tropomyosin (green color). For nuclei detection, cells were counterstained with DAPI (blue color). Scale bars, 50 μ m (Perepelina et al., 2022).

To explore the alteration of the cardiac-specific genes expression in the cardiomyocytes due to *LMNA* R249Q mutation, we used qPCR method. We analyzed the expression of the follow genes: *TBXT*, *ISL1*, *GATA4*, *MEF2C* (cardiac transcription factors), *TNNT2* and *MYH7* (sarcomeric genes), in control and *LMNA* R249Q iPSC-CMs on a different developmental stages of cardiogenic differentiation (0, 2, 5, 7, 14, 21 days) (Figure 32).

At the day 2 expression level of the *TBXT* (Brachyury) was noted to be increase, reflecting activates mesoderm formation. Interestingly, that *LMNA* R249Q caused increase *TBXT* expression level compared to control iPSC-CMs. Expression of the essential early-stage cardiac genes (*ISL1*, *GATA4*, *MEF2C*) was detected after day 2 of differentiation. In detail, *LMNA* R249Q caused increase of the *ISL1* expression level on 5, 7, 14, and 21 days of differentiation. *LMNA* R249Q iPSC-CMs characterized by higher *GATA* expression level on day 7, and increased *MEF2C* expression level on 5, 7, 14 days of cardiogenic differentiation compared to control.

Expression of the *TNNT2* and *MYH7* (late-stage cardiac-specific markers) was observed from 5-7 days of differentiation. *LMNA* R249Q caused increase of the *TNNT2* level in the iPSC-CMs on day 5 and day 21 of differentiation compared to control iPSC-CMs. *MYH7* expression was significantly increased in *LMNA* R249Q iPSC-CMs compared to control iPSC-CMs on day 14 and day 21 of differentiation.

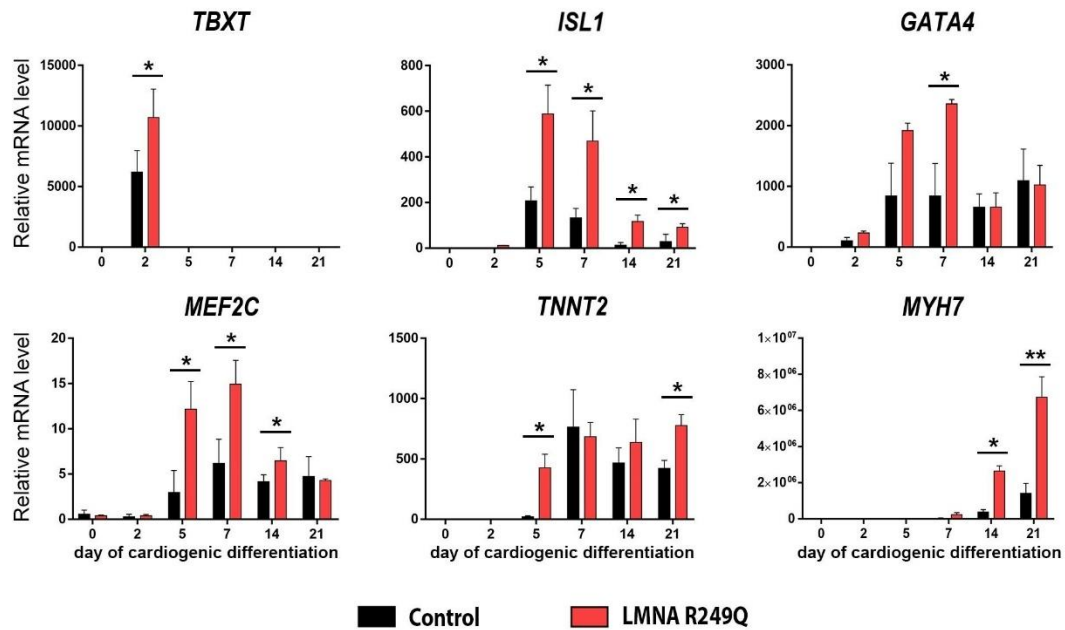


Figure 32. Cardiac genes expression in control iPSC-CMs and *LMNA* R249Q iPSC-CMs on different stages of cardiogenic differentiation as measured by qPCR. A value of 1 was given to mRNA levels for Control iPSC on day 0 of cardiogenic differentiation for all genes. The results are represented as mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Perepelina et al., 2022).

To sum up, *LMNA* R249Q iPSC-CMs demonstrated increased expression levels of mesodermal and cardiac-specific transcription factors as well as sarcomeric genes, indicating overall dysregulation of gene expression profile in iPSC-CMs carrying *LMNA* R249Q mutation (Perepelina et al., 2022).

3.4.3 Evaluation of the *LMNA* R249Q effect on the expression profile of iPSC-CMs at the late stage of differentiation

To elucidate whether the *LMNA* R249Q can affect gene expression in mature CMs we focused on the late-stage of cardiogenic differentiation (day 21) (Figure 33). We explored the expression of genes coding for sarcomeric proteins—*ACTN2* and *FLNC* (Figure 33, A), and found a significant upregulation of these genes in CMs carrying *LMNA* R249Q compared to control CMs. In addition, we observed a significant increase in the expression level of the *DMPK* gene, encoding myotonic dystrophy protein kinase (Figure 33, B), and increased expression level of the *SCN5A* gene, encoding cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. However, any changes in the expression of genes coding for ion channels *SCN4B*, *TRPM4*, and *HCN4* have not been found (Figure 33, C). Genes encoding components of intercellular contacts such as *PKP2*, *DSP*, and *GJA5* were downregulated in *LMNA* R249Q CMs (Figure 33, D). Thus, observed complex alterations in the expression level of the key structural genes could contribute to the cardiac manifestation of the laminopathies (Perepelina et al., 2022).

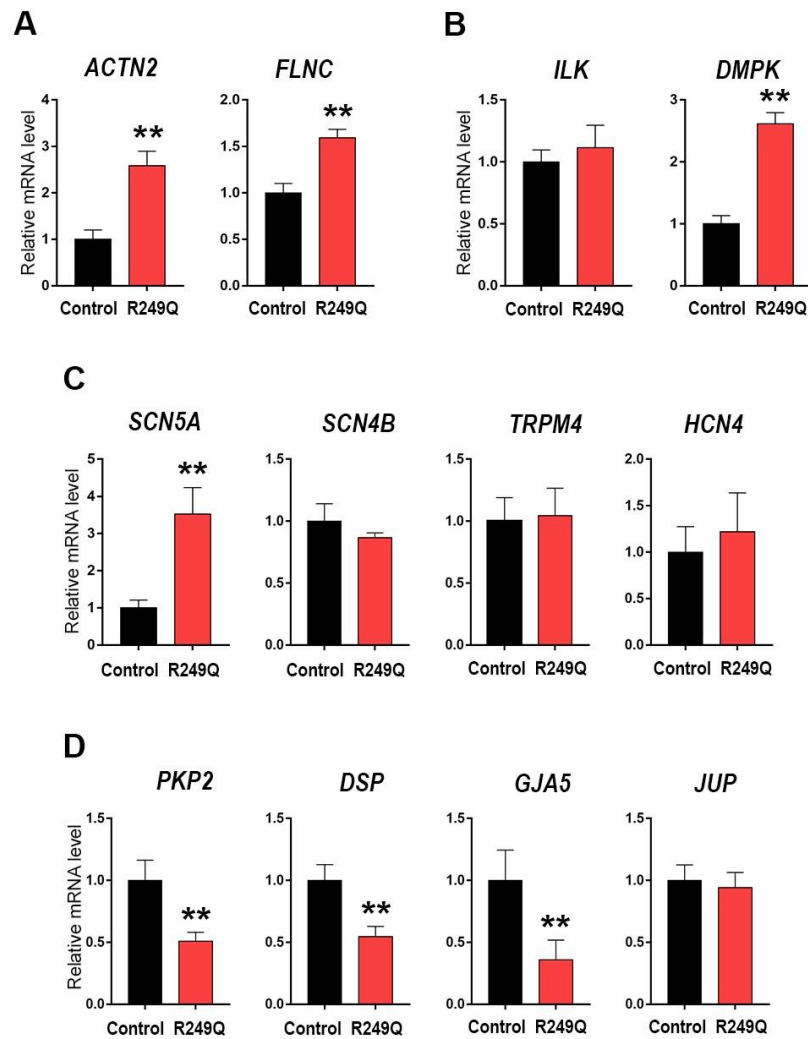


Figure 33. Cardiac genes expression in Control iPSC-CMs and *LMNA* R249Q iPSC-CMs on day 21 of the cardiogenic differentiation. mRNA level was measured by qPCR. The results are represented as mean \pm SD; ** $p < 0.01$. (A) Level expression of the genes connected to sarcomeric cytoskeleton. (B) Genes encoding regulatory cardiac kinase. (C) Genes encoding ion channels. (D) Genes encoding proteins of an intercalated discs (Perepelina et al., 2022).

3.4.4 Electrophysiological characterization of iPSC-CMs carrying *LMNA* R249Q mutation

Biophysical parameters of sodium current were obtained using sodium current recording via patch-clamp technique. The sodium current density was obtained by normalizing the current strength values to the value of the membrane capacitance, which was compensated individually for each cell.

All experimental groups demonstrated typical sodium current traces (Figure 34, A). The peak current density of iPSC-CMs from two different healthy controls did not differ significantly (Figure 34, B, Table 4). However, patient's iPSC-CMs showed a marked reduction of peak current density compared with both controls. The analysis of the current-voltage relationship revealed that iPSC-CMs from both controls had their maximal current at -25 mV, whereas the patient's iPSC-CMs had a maximal current at a more depolarized potential of -20 mV (Figure 34, C). It is well known that decreased current density may be caused by alterations in channel gating as well as protein trafficking disturbances.

To examine the reasons for sodium current density reduction, we explored the kinetic parameters of the channel steady-state activation and inactivation. *LMNA* R249Q iPSC-CMs demonstrated a significant depolarizing shift of the voltage-dependence of steady-state activation compared to control iPSC-CMs (Figure 34, D, Table 4). These changes in channel gating properties indicate loss-of-function of the sodium channel in patient-derived iPSC-CMs. Surprisingly, the voltage-dependence of steady-state inactivation was shifted to depolarized potential (Figure 34, E, Table 4), which is typical for gain-of-function phenotype.

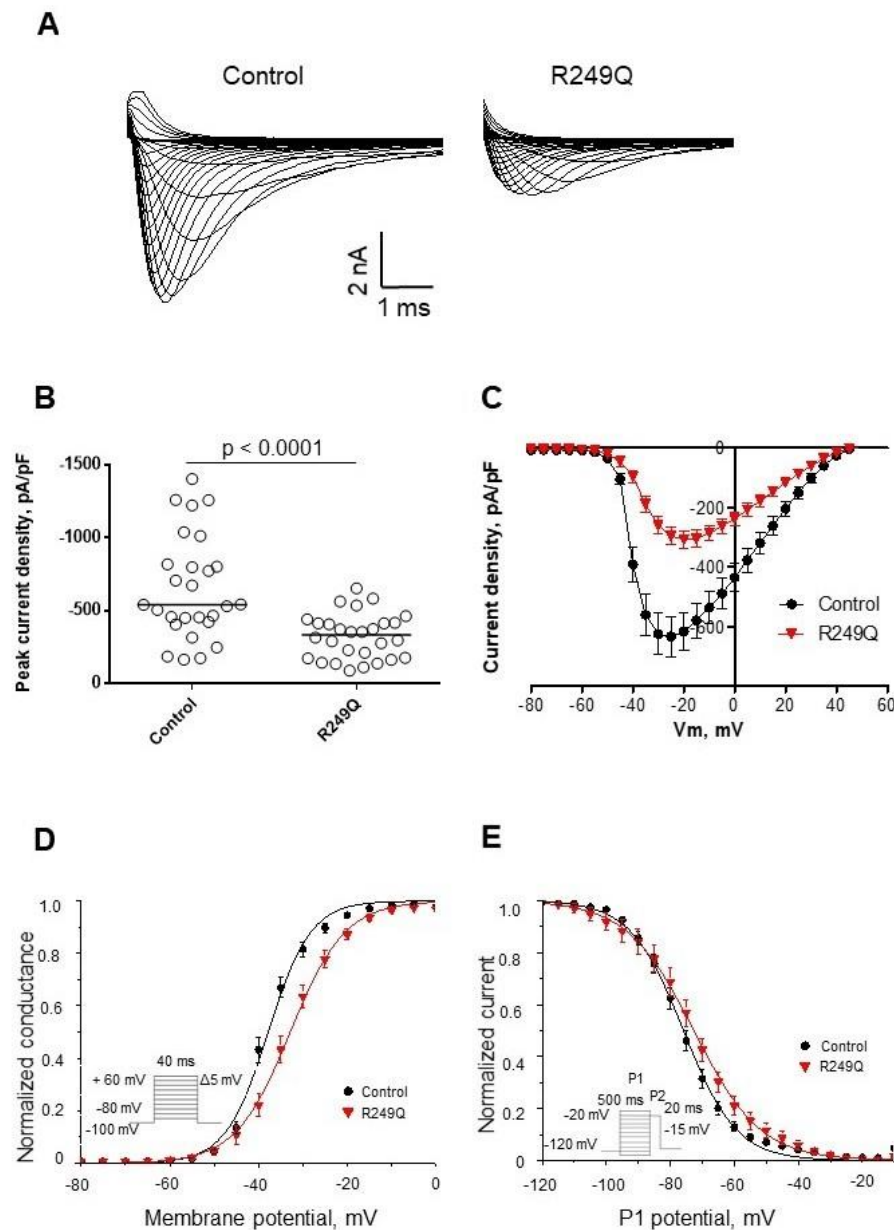


Figure 34. Functional characterization of sodium channel activity in iPSC-CMs carrying R249Q genetic variant in *LMNA* gene. (A) Typical sodium current traces in iPSC-CMs. (B) Peak sodium current densities for control and patient's iPSC-CMs. Data presented as medians. Patient's iPSC-CMs demonstrated marked decrease in sodium current density. (C) Current-voltage relationship of sodium channel in control and patient's iPSC-CMs. (D) Voltage-dependence of steady-state activation for control and patient's iPSC-CMs. Patient's iPSC-CMs showed delayed activation. (E) Voltage-dependence of steady-state inactivation for control and patient's iPSC-CMs. Patient's iPSC-CMs demonstrated impaired inactivation (Perpelina et al., 2022).

		Control	n	R249Q	n	p
Current density at -20mV	pA/pF	-652.9 ± 68.4	27	-324.9 ± 29.3	28	p<0.0001
Steady-state activation	V _{1/2} , mV	-37.7 ± 0.8	27	-33.0 ± 1.2	28	0.002
	k	4.0 ± 0.3		4.7 ± 0.2		0.02
Steady-state inactivation	V _{1/2} , mV	-75.7 ± 1.3	23	-73.4 ± 2.5	22	0.09
	k	7.1 ± 0.3		8.0 ± 0.4		0.07

Table 4. Biophysical parameters of sodium current in iPSC-CMs obtained from control and the patient's iPSC-CMs. Capacitance. Control iPSC-CMs: 9.5 ± 0.85 pF; patient's iPSC-CMs: 11.4 ± 0.8 pF. $p=0.07$, (Perepelina et al., 2022).

Thus, the *LMNA* R249Q mutation resulted in altered sodium channel functional activity of iPSC-CMs, reflecting the complex influence of the *LMNA* variant on the electrophysiological properties of the patient's cardiac myocytes. Therefore, observed changes in sodium current characteristics can be considered as a possible mechanism of arrhythmia development in this patient (Perepelina et al., 2022).

3.4.5 Discussion of the results obtained in the study of the *LMNA* R249Q mutation effect on the process of cardiogenic differentiation of the iPSC

One of the most common manifestations of laminopathies is known to be heart rhythm and conduction abnormalities, including atrial fibrillation, ventricular arrhythmia, as well as sudden cardiac death. Cardiac system abnormalities can exist as a separate disease or as an accompanying pathology (Chaffee et al. 2014; Chandar et al. 2010; Chen et al. 2019; Corrigan et al. 2005; Fatkin et al. 1999). Lamin A/C is known to be a regulator of gene expression (Osmanagic-Myers and Foisner, 2019). Thus, we assessed the expression of cardiac-specific genes in *LMNA* R249Q iPSC-CMs on the late-stage of cardiac differentiation. We have demonstrated that *LMNA* R249Q mutation leads to overexpression of the genes encoding the cytoskeletal proteins actin and filamin C. Both filamin C and actin are known to facilitate the cortical cytoskeleton, thereby protecting the cardiomyocyte's structure from mechanical stress (Fujita et al., 2012). Whereas that lamin A/C interacts with actin through the LINC complex and participates in the regulation of the structural architecture of the contractile tissue (Swift et al., 2013), mutated lamin A/C can affect sarcomere structuration. Moreover, lamin A/C, being involved in the regulation of the gene expression, can cause changes in the transcriptional status of the cell due to *LMNA* mutation.

Besides, we established the alterations in cardiac-specific gene expression in *LMNA* R249Q iPSC-CMs during the different stages of the differentiation. Given mutations in the *LMNA* gene lead to rearrangement of the spatial anchoring of genomic regions (LADs) to the nuclear lamina, its conformational changes are known to cause dysregulation of the gene expression (Briand and Collas, 2020). Consequently, the earlier launch of the differentiation program can occur. In the present study, we found an enhanced cardiogenic differentiation capacity of the iPSC carrying the *LMNA* R249Q genetic variant. In the earlier report, an activation effect of the tissue-specific *LMNA* genetic variants on the adipogenic and osteogenic

potential of human multipotent mesenchymal stromal cells was described (Malashicheva et al., 2015). Another research established that both *LMNA* G232E/R482L variants caused dysregulation of muscle differentiation (Ignatieva et al., 2020). From this perspective, we can assume that lamin A/C plays an essential role in cell fate determination, and *LMNA* R249Q genetic variant leads to dysregulation of the differentiation program in the iPSC-CMs model.

Though clinical manifestations of cardiac arrhythmias and conduction abnormalities linked to *LMNA* variants have frequently been reported, there are only a few reports of cardiac ion channel changes associated with *LMNA* genetic variants. In the present study, we determined that in *LMNA* R249Q iPSC-CMs, electrophysiological functions of the cardiac sodium channel were markedly altered.

Recent work on iPSC-CMs revealed the effect of the *LMNA* K219T on the $\text{Na}_v1.5$ function. *LMNA* K219T expression resulted in a decreased sodium current density and slower conduction velocity combined with reduced *SCN5A* (encoding Nav 1.5), thus indicating an impaired activity of $\text{Na}_v1.5$ channels (Salvarani et al., 2019). Our study found a similar effect of the *LMNA* R249Q variant on the $\text{Na}_v1.5$ parameters, decreased sodium current density, and changes in sodium current kinetics. The genotype-phenotype correlation between *LMNA* genetic variant and the resultant phenotype implies that pathologies caused by closely localized substitutions (both are localized in the rod domain of lamin A/C filament) share a common disease mechanism (Scharner et al., 2010). However, in the present study, the expression of *SCN5A* in *LMNA* R249Q iPSC-CMs was increased, which could be a compensatory alteration. Probably even closely localized mutations in the *LMNA* do not share the completely identical pathogenic mechanisms via the epigenetically mediated regulation of *SCN5A* expression.

The question remains open whether the sodium current dysfunction is a primary or secondary consequence of the observed genetic variant in the *LMNA* gene. According to the expression data, *LMNA* R249Q iPSC-CMs had decreased levels of *PKP2*, *DSP*, and *GJA5*. The role of cell junction proteins in proper channel localization and function in intercalated discs is well established. Plakophilin and desmoplakin were reported to be integrated in the macromolecular complex of $\text{Na}_v1.5$ in an intercalated discs pool of sodium channels (Shy et al., 2013). $\text{Na}_v1.5$ was shown to be co-localized with plakophilin in intercalated discs, and the loss of *PKP2* expression resulted in sodium current reduction in a culture of cardiac myocytes (Sato et al. 2009). The iPSC-CMs-based studies of the effect of *PKP2* mutations on sodium current confirmed that *PKP2* haploinsufficiency could lead to decreased sodium channel activity (Khudiakov et al., 2020). Thus, in the current study, we further support the hypothesis that impaired expression of *PKP2* can lead to $\text{Na}_v1.5$ dysfunction.

Along with the previous electrophysiological characterization of the *DSP* H1684R variant in iPSC-CMs linked to the decreased sodium and calcium currents (Gusev et al. 2020), the present results underscore the importance of intercellular contact proteins in proper channel functioning. The role of the impaired expression of *GJA5* in sodium channel dysfunction remains unclear, despite the reported association of

GJA5 mutations with atrial fibrillation (Bai, 2014). Taken together, the sodium current reduction can be considered a consequence of PKP2 and DSP deficiency in the *LMNA* patient cells. Precise molecular mechanisms underlying the electrophysiological defects in *LMNA*-associated cardiomyopathy remain unclear and demand further investigations.

To sum up, our results support the fundamental role of lamin A/C in cardiogenic differentiation, regulation of cardiogenic gene expression, and electrophysiology properties of the sodium ion channel (Perepelina et al., 2022).

CONCLUSION

Laminopathies are known to be severe hereditary diseases that are manifested as tissue-specific disorders, i.e. predominantly affect one type of tissue. Currently, these forms of laminopathies remain insufficiently studied concerning their pathogenic mechanisms. Therefore, to study the mechanisms of laminopathies' development, this study used point mutations in the *LMNA* gene associated with certain tissue-specific forms of diseases.

Considering the different mutations in the *LMNA* gene cause various tissue-specific disorders suggests that they play a significant role in cell differentiation. Indeed, the role of A-type lamins in cell differentiation processes has already been shown using *LMNA* knockout mouse models (Zhang et al., 2013), in stem cell models where the *LMNA* gene transcription is inhibited by siRNA (Akter et al., 2009). However, the loss of lamin function does not meet the conditions required for the development of tissue-specific forms of laminopathies. Mutations causing autosomal dominant forms of laminopathies lead to the gain of new functions by lamin A/C (gain-of-function), and do not lead to suppression of the synthesis and functioning of endogenous forms of lamin A/C in the cell. The introduction of exogenous *LMNA* is known to lead to the synthesis of a protein that can "compete" with the standard form for incorporation into the nuclear lamina (Boguslavsky et al., 2006). This knowledge justifies the experimental model of the study, in which, by introducing exogenous forms of lamin we can model various forms of laminopathies and study tissue-specific disorders that occur under the influence of mutations in the *LMNA* gene during the differentiation of mesenchymal origin cells.

Since tissues of mesenchymal origin, namely, muscle, fat, and bone, are more affected by lamin mutations, we used cells of mesenchymal origin as a differentiation model. Thus, we studied the disorders of the myogenic, adipogenic, and osteogenic differentiation processes caused by tissue-specific mutations in the *LMNA* gene using different cell models: C2C12 mouse myoblasts and mouse satellite cells (muscle model); human CMC (adipogenic model); human EC, CMC, SMC, and IC (osteogenic model). In addition, we used iPSCs as a model for cardiogenic differentiation, which, as previously shown, successfully differentiate into cardiomyocytes (Burrige et al., 2014; Lian et al., 2013).

In general, the obtained results confirm the tissue-specific manner of the laminopathies' development. Mutations in a specific manner lead to dysregulation of differentiation processes at the gene expression level as well as at the morphological level. In particular, we found that G232E and R571S mutations in the *LMNA* gene disrupt the myogenic differentiation of C2C12 myoblasts and mouse satellite cells: the formation of myotubes is disrupted, as well as the expression of myogenic markers. The *LMNA* G232E mutation had the greatest inhibitory effect on muscle differentiation, thereby confirming the tissue-specific manner of the laminopathies' development (Perepelina et al., 2017). Next, we observed the inhibitory effect of the *LMNA* R482L mutation on adipogenic differentiation of CMC (Perepelina et al., 2018). *LMNA*

R527C and *LMNA* R471C mutations have also been shown to negatively affect the process of osteogenic differentiation of mesenchymal cells. However, the degree and manner of this effect differ in different cells of mesenchymal origin (Perepelina et al., 2019). The results concerning the *LMNA* R249Q impact on the cardiogenic differentiation of iPSCs demonstrated that the patient's iPSCs characterized an increased potential for cardiogenic differentiation, however, at the electrophysiological level, the mutation led to a slowdown in the kinetics of the Nav 1.5 channel and a decrease in sodium current density, compared with control iPSC-CMs. Furthermore, a decrease in the expression of genes encoding desmosomal proteins (*PKP2*, *DSP*, and *GJA5*), as well as an increase in the expression level of *SCN5A* encoding cardiac Nav 1.5. We hypothesize that decreased expression of *PKP2*, *DSP*, and *GJA5* via *LMNA* mutations affect the functioning of Nav 1.5; increased expression of *SCN5A* can be considered as a compensatory mechanism (Perepelina et al., 2022).

In our work, mutations lead to a change in the differentiation properties of cells used as a model. However, the same mutations in the other cells will not have the same effect on cell differentiation (tissue-specific manner of the action of lamin mutations). For example, various tissue-specific mutations introduced into MSCs had not equal effect on cell differentiation, as it was shown in a previous work (Malashicheva et al., 2015). The introduced mutations do not turn off lamin functions. In contrast, mutations modulate them in such a way that, in the case of some mutations, the differentiation efficiency not only does not decrease but may even increase. Based on our results and the results obtained in other studies, it can be assumed that the observed different effects of mutations may indicate that the differentiation potential of cells is regulated by some balance of lamin forms, and a violation of this balance may lead to a shift in differentiation to another direction. As a result, different mutations of the same gene lead to a change in the differentiation potential and, as a consequence, to different disease phenotypes.

Epigenetic mechanisms also play a significant role in cell differentiation. As noted above, lamins can interact with certain regions of the genome (LADs) and affect gene expression. The reports of Lund et al. demonstrated that depending on the way these interactions in stem cells a differentiation program can be launched in a certain direction (Lund et al., 2013; Lund and Collas, 2013). Apparently, in the process of cell differentiation, spatial rearrangements of genomic regions occur towards or away from the lamina. Thus, genes included in LADs associated with the lamina can transform into a repressed state, and, conversely, genes dissociated from the lamina can transform into an actively expressed state. Thus, the genes necessary for specific differentiation are activated by separating sections of the genome from the nuclear lamina.

Abnormal folding of lamin A/C due to *LMNA* mutations leads to disruption of the integrity and function of the nuclear lamina, and as a result, the proper interaction of chromatin with lamins is disrupted. These conformational changes lead to dysregulation of gene expression, including genes responsible for differentiation (Melcer and Meshorer, 2010; Scaffidi and Misteli, 2008; Zhang et al., 2019). These genome

reorganizations are cell cycle stage-dependent and vary across cells (Bitman-Lotan and Orian, 2021; Shah et al., 2021).

Another goal of the work was to study the combined effect of mutations in the *LMNA* gene and the Notch signaling pathway in the process of cell differentiation. The Notch pathway is one of the main pathways of intercellular signaling that determines cell fate, as well as the ratio of stem properties and the ability of cells to differentiate. Notch acts in a diversity of cells and tissue types, and its outcome is highly dependent on the cellular environment. Our data suggest that A-type lamins may interact with components of the Notch pathway. We demonstrated that overactivation of the Notch pathway led to inhibition of the adipogenic differentiation process in CMC (Perepelina et al., 2018). At the same time, Notch overactivation activates osteogenic differentiation of the CMC and IC (Perepelina et al., 2019). There are some suggestions that genes encoding components of the Notch pathway may directly interact with the nuclear lamina (Meshorer and Gruenbaum 2008). From this perspective, we can assume that some mutations can disrupt the interaction sites of lamins with target genes of the Notch signaling pathway.

The study of the molecular mechanisms of laminopathies' development is a multifaceted study that requires the application of various approaches. Based on the results obtained in this study, it can be argued that the differentiation decisions of the cell depend on many factors, including the specific *LMNA* mutation, the degree of activity of the Notch pathway, as well as the origin of the cell. It is important to study the totality of possible changes in the cell due to the *LMNA* mutations, including epigenetic changes and disturbances in the interaction of lamins with signaling pathway components, and to assess how these changes affect differentiation processes. Such studies will make it possible to understand the overall picture of the molecular mechanism that leads to the development of these serious diseases.

To sum up, we can do some **conclusions**:

1. Mutations *LMNA* G232E and *LMNA* R571S lead to impaired muscle differentiation of mouse satellite cells and C2C12 cells.
2. The *LMNA* R482L mutation suppresses the process of adipogenic differentiation by reducing the activity of the Notch pathway.
3. *LMNA* R527C mutation suppresses osteogenic differentiation and Notch activity in human mesenchymal cardiac cells while *LMNA* R527C mutation activates osteogenic differentiation and Notch in human aortic valve interstitial cells.
4. A-type lamins cooperating with the Notch pathway affect the process of cell differentiation in a tissue-specific manner.
5. The *LMNA* R249Q mutation leads to a change in the expression profile of cardiomyocytes

obtained from the patient's induced pluripotent stem cells: an increase in the expression of genes encoding structural proteins; a decrease in the expression of genes encoding desmosome proteins.

6. The *LMNA* R249Q mutation leads to a change in the electrophysiological properties of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells: a decrease in the peak density of sodium current, a slowdown in stationary activation of sodium current, a slowdown in stationary inactivation of sodium current.

ABBREVIATIONS

- BSA – bovine serum albumin
cDNA – complementary DNA
CM - cardiomyocyte
CMC – cardiac mesenchymal cells
CSL – CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1 (transcription factor that is responsible for activating the genes downstream of the Notch pathway)
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCM – dilated cardiomyopathy
DMSO – dimethyl sulfoxide
DNA – deoxyribonucleic acid
EC – human umbilical vein endothelial cells
EDMD – Emery-Dreifuss muscular dystrophy
FBS – fetal bovine serum
hES – human embryonic stem cells
HS – horse serum
IC – interstitial cells of the human aortic valve
iPSC – induced pluripotent stem cells
LAD – lamina associated domain
LMNA – lamin A/C gene
MEF – mouse embryonic fibroblast
MSC – mesenchymal stem cells
NICD – Notch intracellular domain
NLS – nuclear localization signal
PBMC – peripheral blood mononuclear cells
PBS – phosphate buffer saline
PCR – polymerase chain reaction
PEI – polyethylenimine hydrochloride
PFA – paraformaldehyde
RNA – ribonucleic acid
RT-PCR – reverse transcription PCR
SMC – human aortic smooth muscle cells

REFERENCES

- 1 Bogdanova, M.A., Gudkova A.Ya., Zabirnik, A.S., Ignatieva, E.V., Dmitrieva, R.I., Smolina, N.A., Kostareva, A.A., Malashicheva, A.B. 2014. Role of nuclear lamins A/C in osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytology*. 56(4): 260–266.
- 2 Malashicheva, A.B., Sabirova, A.A., Kozyrev, I.A., Golovkin, A.S., Khudyakov, A.A., Kostareva, A.A. 2015. Comparative characteristics of cardiac stem cells obtained from the myocardium of children and adults. *Regional circulation and microcirculation*. 14(3): 52–258.
- 3 Perepelina, K.I., Smolina, N.A., Zabinik, A.S., Dmitrieva, R.I., Malashicheva, A.B., Kostareva, A.A. 2017b. Effect of mutations in the LMNA gene on myogenic differentiation of primary satellite cells and C2C12 cells. *Cytology* 59(2): 117–124.
- 4 Adam, S.A., Butin-Israeli, V., Cleland, M.M., Shimi, T., Goldman, R.D., 2013. Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors. *Nucl. (United States)* 4, 142–150.
- 5 Agarwal, A.K., Fryns, J.P., Auchus, R.J., Garg, A., 2003. Zinc metalloproteinase ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1995–2001.
- 6 Ahn, J., Jo, I., Kang, S. mi, Hong, S., Kim, S., Jeong, S., Kim, Y.H., Park, B.J., Ha, N.C., 2019. Structural basis for lamin assembly at the molecular level. *Nat. Commun.* 10, 1–12.
- 7 Akter, R., Rivas, D., Geneau, G., Drissi, H., Duque, G., 2009. Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function. *J. Bone Miner. Res.* 24, 283–293.
- 8 Alcorta-Sevillano, N., Macías, I., Rodríguez, C.I., Infante, A., 2020. Crucial Role of Lamin A/C in the Migration and Differentiation of MSCs in Bone. *Cells*. 26;9(6):1330.
- 9 Andersson, E.R., Sandberg, R., Lendahl, U., 2011. Notch signaling: Simplicity in design, versatility in function. *Development* 138, 3593–3612.
- 10 Andrés, V., González, J.M., 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J. Cell Biol.* 187, 945–957.
- 11 Bai, D., 2014. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms. *FEBS Lett.* 588, 1238–1243.
- 12 Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., Vaubourdolle, M., 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat. Protoc.* 2, 481–485.
- 13 Bermeo, S., Vidal, C., Zhou, H., Duque, G., 2015. Lamin A/C Acts as an Essential Factor in Mesenchymal Stem Cell Differentiation Through the Regulation of the Dynamics of the Wnt/ β -Catenin Pathway. *J. Cell. Biochem.* 116, 2344–2353.
- 14 Bertrand, A.T., Chikhaoui, K., Yaou, R. Ben, Bonne, G., 2011. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1687–1692.
- 15 Bitman-Lotan, E., Orian, A., 2021. Nuclear organization and regulation of the differentiated state. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 3141–3158.
- 16 Blondel, S., Jaskowiak, A.-L., Egesipe, A.-L., Le Corf, A., Navarro, C., Cordette, V., Martinat, C., Laabi, Y., Djabali, K., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., Peschanski, M., Nissan, X., 2014. Induced Pluripotent Stem Cells Reveal Functional Differences Between Drugs Currently Investigated in Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 510–519.
- 17 Boban, M., Braun, J., Foisner, R., 2010. Lamins: “Structure goes cycling.” *Biochem. Soc. Trans.* 38, 301–306.
- 18 Boguslavsky, R.L., Stewart, C.L., Worman, H.J., 2006. Nuclear lamin A inhibits adipocyte

- differentiation: Implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 653–663.
- 19 Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z., 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801.
 - 20 Bourgeois, B., Gilquin, B., Tellier-Lebègue, C., Östlund, C., Wu, W., Pérez, J., Hage, P. El, Lallemand, F., Worman, H.J., Zinn-Justin, S., 2013. Inhibition of TGF- β signaling at the nuclear envelope: Characterization of interactions between MAN1, Smad2 and Smad3, and PPM1A. *Sci. Signal.* 6, 1–11.
 - 21 Brachner, A., Foisner, R., 2011. Evolvement of LEM proteins as chromatin tethers at the nuclear periphery. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1735–1741.
 - 22 Bray, S.J., 2006. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
 - 23 Briand, N., Collas, P., 2020. Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol.* 21, 1–25.
 - 24 Burke, B., Stewart, C.L., 2013. The nuclear lamins: Flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 13–24.
 - 25 BurrIDGE, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., Plews, J.R., Abilez, O.J., Cui, B., Gold, J.D., Wu, J.C., 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* 11, 855–860.
 - 26 Cadot, B., Gache, V., Vasyutina, E., Falcone, S., Birchmeier, C., Gomes, E.R., 2012. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep.* 13, 741–749.
 - 27 Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R., Clore, G.M., 2001. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: One binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J.* 20, 4399–4407.
 - 28 Capanni, C., Cenni, V., Mattioli, E., Sabatelli, P., Ognibene, A., Columbaro, M., Parnaik, V.K., Wehnert, M., Maraldi, N.M., Squarzone, S., Lattanzi, G., 2003. 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. *Exp. Cell Res.* 291, 122–134.
 - 29 Case, N., Rubin, J., 2010. β -catenin - A supporting role in the skeleton. *J. Cell. Biochem.* 110, 545–553.
 - 30 Cattin, M.E., Muchir, A., Bonne, G., 2013. “State-of-the-heart” of cardiac laminopathies. *Curr. Opin. Cardiol.* 28, 297–304.
 - 31 Chaffee, B.R., Shang, F., Chang, M.L., Clement, T.M., Eddy, E.M., Wagner, B.D., Nakahara, M., Nagata, S., Robinson, M.L., Taylor, A., 2014. Nuclear removal during terminal lens fiber cell differentiation requires CDK1 activity: Appropriating mitosis-related nuclear disassembly. *Dev.* 141, 3388–3398.
 - 32 Chandar, S., Yeo, L.S., Leimena, C., Tan, J.C., Xiao, X.H., Nikolova-Krstevski, V., Yasuoka, Y., Gardiner-Garden, M., Wu, J., Kesteven, S., Karlsdotter, L., Natarajan, S., Carlton, A., Rainer, S., Feneley, M.P., Fatkin, D., 2010. Effects of mechanical stress and carvedilol in lamin A/C-deficient dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* 106, 573–582.
 - 33 Chen, S.N., Lombardi, R., Karmouch, J., Tsai, J.Y., Czernuszewicz, G., Taylor, M.R.G., Mestroni, L., Coarfa, C., Gurha, P., Marian, A.J., 2019. DNA Damage Response/TP53 Pathway Is Activated and Contributes to the Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy Associated with LMNA (Lamin A/C) Mutations. *Circ. Res.* 124, 856–873.

- 34 Chichagova, V., Sanchez-Vera, I., Armstrong, L., Steel, D., Lako, M., 2015. Generation of human induced pluripotent stem cells using rna-based sendai virus system and pluripotency validation of the resulting cell population. *Methods Mol. Biol.* 1353, 285–307.
- 35 Chin, I.L., Hool, L., Choi, Y.S., 2019. A review of in vitro platforms for understanding cardiomyocyte Mechanobiology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–10.
- 36 Cobb, A.M., Murray, T. V., Warren, D.T., Liu, Y., Shanahan, C.M., 2016. Disruption of PCNA-lamins A/C interactions by prelamin A induces DNA replication fork stalling. *Nucleus* 7, 498–511.
- 37 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., 2013. Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of *lap2 α* . *Hum. Mol. Genet.* 22, 2852–2869.
- 38 Collas, P., 2010. The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol. Biotechnol.* 45, 87–100.
- 39 Corrigan, D.P., Kuszczak, D., Rusinol, A.E., Thewke, D.P., Hrycyna, C.A., Michaelis, S., Sinensky, M.S., 2005. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem. J.* 387, 129–138.
- 40 Crasto, S., Di Pasquale, E., 2018. Induced pluripotent stem cells to study mechanisms of laminopathies: Focus on epigenetics. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 1–14.
- 41 Cremer, C., Szczurek, A., Schock, F., Gourram, A., Birk, U., 2017. Super-resolution microscopy approaches to nuclear nanostructure imaging. *Methods* 123, 11–32.
- 42 Cremer, T., Cremer, M., 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–23.
- 43 de las Heras, J.I., Meinke, P., Batrakou, D.G., Srsen, V., Zuleger, N., Kerr, A.R.W., Schirmer, E.C., 2013. Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity. *Nucl.* 4(6):460-77.
- 44 de Leeuw, R., Gruenbaum, Y., Medalia, O., 2018. Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol.* 28, 34–45.
- 45 Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., Kleckner, N., 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* (80-.). 295, 1306–1311.
- 46 Demmerle, J., Koch, A.J., Holaska, J.M., 2012. The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J. Biol. Chem.* 287, 22080–22088.
- 47 Donnalaja, F., Carnevali, F., Jacchetti, E., Raimondi, M.T., 2020. Lamin A/C Mechanotransduction in Laminopathies. *Cells.* 24;9(5):1306.
- 48 Dubinska-Magiera, M., Zaremba-Czogalla, M., Rzepecki, R., 2013. Muscle development, regeneration and laminopathies: How lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle development, regeneration and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 2713–2741.
- 49 Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.
- 50 Enyedi, B., Niethammer, P., 2017. Nuclear membrane stretch and its role in mechanotransduction. *Nucleus* 8, 156–161.
- 51 Fatkin D., MacRae C., Sasaki T., Wolff M. R., Porcu M., Frenneaux M., Atherton J., Vidaillet H. J., Spudich S., De Girolami U., Seidman J. G., Seidman C., Muntoni F., Muehle G., Johnson W., M.B., 1999. Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin a/C Gene As 1715–1724.
- 52 Favreau, C., Higuete, D., Buendia, B., Courvalin, J., 2004a. Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts 24, 1481–1492.
- 53 Favreau, C., Higuete, D., Courvalin, J.-C., Buendia, B., 2004b. Expression of a Mutant Lamin A That

- Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits In Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1481–1492.
- 54 Fisher, D.Z., Chaudhary, N., Blobel, G., 1986. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6450–6454.
 - 55 Frock, R.L., Kudlow, B. a, Evans, A.M., Jameson, S. a, Hauschka, S.D., Kennedy, B.K., 2006. Lamin A/ C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev.* 20, 486–500.
 - 56 Fujita, M., Mitsuhashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Nishino, I., Kudo, A., 2012. Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev. Biol.* 361, 79–89.
 - 57 Garg, A., Cogulu, O., Ozkinay, F., Onay, H., Agarwal, A.K., 2005. A novel homozygous Ala529Val LMNA mutation in Turkish patients with mandibuloacral dysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5259–5264.
 - 58 Garg, A., Vinaitheerthan, M., Weatherall, P.T., Bowcock, A.M., 2001. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin A/C gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 59–65.
 - 59 Gerace, L., Tapia, O., 2018. Messages from the voices within: regulation of signaling by proteins of the nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 14–21.
 - 60 Gerbino, A., Procino, G., Svelto, M., Carosino, M., 2018. Role of Lamin A/C Gene Mutations in the signaling defects leading to cardiomyopathies. *Front. Physiol.* 9, 1–7.
 - 61 González, J.M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P., Andrés, V., 2008. Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 183, 653–666.
 - 62 Gonzalo, S., Kreienkamp, R., Askjaer, P., 2017. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res. Rev.* 33, 18–29.
 - 63 Gruenbaum, Y., Foisner, R., 2015. Lamins: Nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 131–164.
 - 64 Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., De Klein, A., Wessels, L., De Laat, W., Van Steensel, B., 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948–951.
 - 65 Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., BurrIDGE, K., 2014. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* 16, 376–381.
 - 66 Gusev, K., Khudiakov, A., Zaytseva, A., Perepelina, K., Makeenok, S., Kaznacheyeva, E., Kostareva, A., 2020. Impact of the DSP-H1684R genetic variant on ion channels activity in iPSC-derived cardiomyocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 54, 696–706.
 - 67 Håkelién, A.M., Delbarre, E., Gaustad, K.G., Buendia, B., Collas, P., 2008. Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects. *Exp. Cell Res.* 314, 1869–1880.
 - 68 Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C., Shackleton, S., 2006. SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3738–3751.
 - 69 Harr, J.C., Luperchio, T.R., Wong, X., Cohen, E., Wheelan, S.J., Reddy, K.L., 2015. Directed targeting

- of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *J. Cell Biol.* 208, 33–52.
- 70 Hegele, R.A., 2005. LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin. Genet.* 68, 31–34.
- 71 Hellemans, J., Preobrazhenska, O., Willaert, A., Debeer, P., Verdonk, P.C.M., Costa, T., Janssens, K., Menten, B., Van Roy, N., Vermeulen, S.J.T., Savarirayan, R., Van Hu, W., Vanhoenacker, F., Huylebroeck, D., De Paepe, A., Naeyaert, J.M., Vandesompele, J., Speleman, F., Verschueren, K., Coucke, P.J., Mortier, G.R., 2004. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat. Genet.* 36, 1213–1218.
- 72 Henrique, D., Schweisguth, F., 2019. Mechanisms of notch signaling: A simple logic deployed in time and space. *Dev.* 146.
- 73 Heo, S.J., Driscoll, T.P., Thorpe, S.D., Nerurkar, N.L., Baker, B.M., Yang, M.T., Chen, C.S., Lee, D.A., Mauck, R.L., 2016. Differentiation alters stem cell nuclear architecture, mechanics, and mechano-sensitivity. *Elife* 5, 1–21.
- 74 Herrmann, H., Aebi, U., 2004. Intermediate Filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 749–789.
- 75 Hirano, Y., Hizume, K., Kimura, H., Takeyasu, K., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., 2012. Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *J. Biol. Chem.* 287, 42654–42663.
- 76 Hori, K., Sen, A., Artavanis-Tsakonas, S., 2013. Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 2135–2140.
- 77 Ignatieva, E. V., Ivanova, O.A., Komarova, M.Y., Khromova, N. V., Polev, D.E., Kostareva, A.A., Sergushichev, A., Dmitrieva, R.I., 2020. Lmna mutations g232e and r482l cause dysregulation of skeletal muscle differentiation, bioenergetics, and metabolic gene expression profile. *Genes (Basel)*. 11, 1–20.
- 78 Ikegami, K., Secchia, S., Almakki, O., Lieb, J.D., Moskowitz, I.P., 2020. Phosphorylated Lamin A/C in the Nuclear Interior Binds Active Enhancers Associated with Abnormal Transcription in Progeria. *Dev. Cell* 52, 699–713.e11.
- 79 Isermann, P., Lammerding, J., 2013. Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Curr. Biol.* 23, R1113–R1121.
- 80 Israeli-Rosenberg, S., Manso, A.M., Okada, H., Ross, R.S., 2014. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ. Res.* 114, 572–586.
- 81 Karoutas, A., Akhtar, A., 2021. Functional mechanisms and abnormalities of the nuclear lamina. *Nat. Cell Biol.* 23, 116–126.
- 82 Kennedy, B.K., Pennypacker, J.K., 2014. RB and lamins in cell cycle regulation and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 773, 127–142.
- 83 Khudiakov, A., Zaytseva, A., Perepelina, K., Smolina, N., Pervunina, T., Vasichkina, E., Karpushev, A., Tomilin, A., Malashicheva, A., Kostareva, A., 2020. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling in iPSC-derived cardiomyocytes generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic variants in plakophilin 2 gene. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866, 165915.
- 84 Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., Gygi, S.P., 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* 44, 325–340.
- 85 Kochin, V., Shimi, T., Torvaldson, E., Adam, S.A., Goldman, A., Pack, C.G., Melo-Cardenas, J.,

- Imanishi, S.Y., Goldman, R.D., Eriksson, J.E., 2014. Interphase phosphorylation of lamin A. *J. Cell Sci.* 127, 2683–2696.
- 86 Kondé, E., Bourgeois, B., Tellier-Lebegue, C., Wu, W., Pérez, J., Caputo, S., Attanda, W., Gasparini, S., Charbonnier, J.B., Gilquin, B., Worman, H.J., Zinn-Justin, S., 2010. Structural analysis of the Smad2-MAN1 interaction that regulates transforming growth factor- β signaling at the inner nuclear membrane. *Biochemistry* 49, 8020–8032.
- 87 Kostina, A., Shishkova, A., Ignatieva, E., Irtyuga, O., Bogdanova, M., Levchuk, K., Golovkin, A., Zhiduleva, E., Uspenskiy, V., Moiseeva, O., Faggian, G., Vaage, J., Kostareva, A., Rutkovskiy, A., Malashicheva, A., 2018. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 114, 211–219.
- 88 Lee, B., Lee, T.H., Shim, J., 2017. Emerin suppresses Notch signaling by restricting the Notch intracellular domain to the nuclear membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 303–313.
- 89 Lee, Y.L., Burke, B., 2018. LINC complexes and nuclear positioning. *Semin. Cell Dev. Biol.* 82, 67–76.
- 90 Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., Palecek, S.P., 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* 8, 162–175.
- 91 Lieberman-aiden, E., Berkum, N.L. Van, Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., 2009. of the Human Genome 33292, 289–294.
- 92 Liu, S.Y., Ikegami, K., 2020. Nuclear lamin phosphorylation: an emerging role in gene regulation and pathogenesis of laminopathies. *Nucleus* 11, 299–314.
- 93 Lund, E., Collas, P., 2013. Nuclear lamins: Making contacts with promoters. *Nucl.* 4(6):424-30.
- 94 Lund, E., Oldenburg, A.R., Collas, P., 2014. Enriched domain detector: A program for detection of wide genomic enrichment domains robust against local variations. *Nucleic Acids Res.* 42(11):e92.
- 95 Lund, E., Oldenburg, A.R., Delbarre, E., Freberg, C.T., Duband-Goulet, I., Eskeland, R., Buendia, B., Collas, P., 2013. Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes. *Genome Res.* 23, 1580–1589.
- 96 Lund, E.G., Duband-Goulet, I., Oldenburg, A., Buendia, B., Collas, P., 2015. Distinct features of lamin A-interacting chromatin domains mapped by Chip-sequencing from sonicated or micrococcal nuclease-digested chromatin. *Nucleus* 6, 30–39.
- 97 Makarov, A.A., Zou, J., Houston, D.R., Spanos, C., Solovyova, A.S., Cardenal-Peralta, C., Rappsilber, J., Schirmer, E.C., 2019. Lamin A molecular compression and sliding as mechanisms behind nucleoskeleton elasticity. *Nat. Commun.* 10, 1–17.
- 98 Malashicheva, A., Bogdanova, M., Zahirnyk, A., Smolina, N., Ignatieva, E., Freilikhman, O., Fedorov, A., Dmitrieva, R., Sjöberg, G., Sejersen, T., Kostareva, A., 2015. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner. *Mol. Genet. Metab.* 115, 118–127.
- 99 Malashicheva, A., Kanzler, B., Tolkunova, E., Trono, D., Tomilin, A., 2007. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis* 45, 456–9.
- 100 Malashicheva, A., Perepelina, K., 2021. Diversity of Nuclear Lamin A/C Action as a Key to Tissue-Specific Regulation of Cellular Identity in Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–18.
- 101 Maniotis, A.J., Chen, C.S., Ingber, D.E., 1997. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure (cell mechanicscell

- engineering integrity extracellular matrix mechanotransduction). *Cell Biol.* 94, 849–854.
- 102 Maraldi, N.M., Capanni, C., Cenni, V., Fini, M., Lattanzi, G., 2011. Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* 112, 979–992.
 - 103 Maraldi, N.M., Lattanzi, G., Cenni, V., Bavelloni, A., Marmioli, S., Manzoli, F.A., 2010. Laminopathies and A-type lamin-associated signalling pathways. *Adv. Enzyme Regul.* 50, 248–261.
 - 104 Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R., Gruenbaum, Y., 2007. Barrier-to-autointegration factor - a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol.* 17, 202–208.
 - 105 Mariappan, I., Gurung, R., Thanumalayan, S., Parnaik, V.K., 2007. Identification of cyclin D3 as a new interaction partner of lamin A/C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 981–985.
 - 106 Martino, F., Perestrelo, A.R., Vinarský, V., Pagliari, S., Forte, G., 2018. Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front. Physiol.* 9, 1–21.
 - 107 Mattout, A., Goldberg, M., Tzur, Y., Margalit, A., Gruenbaum, Y., 2007. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J. Cell Sci.* 120, 77–85.
 - 108 Melcer, S., Meshorer, E., 2010. The silence of the LADs: Dynamic genome-lamina interactions during ESC differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 495–497.
 - 109 Meshorer, E., Gruenbaum, Y., 2008. Gone with the Wnt/Notch: Stem cells in laminopathies, progeria, and aging. *J. Cell Biol.* 181, 9–13.
 - 110 Millay, D.P., Sutherland, L.B., Bassel-duby, R., Olson, E.N., 2014. Myomaker is essential for muscle regeneration Myomaker is essential for muscle regeneration 1641–1646.
 - 111 Mirza, A.N., Gonzalez, F., Ha, S.K., Oro, A.E., 2021. The Sky's the LEMit: New insights into nuclear structure regulation of transcription factor activity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 68, 173–180.
 - 112 Muchir, A., Bonne, G., Van Der Kool, A.J., Van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., De Visser, M., Schwartz, K., 2000. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 9, 1453–1459.
 - 113 Muchir, A., Pavlidis, P., Bonne, G., Hayashi, Y.K., Worman, H.J., 2007. Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: Similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery - Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1884–1895.
 - 114 Muchir, A., Worman, H.J., 2007. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7, 78–83.
 - 115 Naetar, N., Ferraioli, S., Foisner, R., 2017. Lamins in the nuclear interior - Life outside the lamina. *J. Cell Sci.* 130, 2087–2096.
 - 116 Navarro, C.L., Cau, P., Lévy, N., 2006. Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15, 151–161.
 - 117 Neganova, I., Chichagova, V., Armstrong, L., Lako, M., 2017. A critical role for p38MAPK signalling pathway during reprogramming of human fibroblasts to iPSCs. *Sci. Rep.* 7, 1–13.
 - 118 Neganova, I., Shmeleva, E., Munkley, J., Chichagova, V., Anyfantis, G., Anderson, R., Passos, J., Elliott, D.J., Armstrong, L., Lako, M., 2016. JNK/SAPK Signaling Is Essential for Efficient Reprogramming of Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 34, 1198–1212.
 - 119 Oldenburg, A.R., Collas, P., 2016. Mapping nuclear lamin-genome interactions by chromatin immunoprecipitation of nuclear lamins. *Methods Mol. Biol.* 1411, 315–324.
 - 120 Osmanagic-Myers, S., Dechat, T., Foisner, R., 2015. Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes Dev.* 29, 225–237.

- 121 Osmanagic-Myers, S., Foisner, R., 2019. The structural and gene expression hypotheses in laminopathic diseases - Not so different after all. *Mol. Biol. Cell* 30, 1786–1790.
- 122 Ou, H.D., Phan, S., Deerinck, T.J., Thor, A., Ellisman, M.H., O’Shea, C.C., 2017. ChromEAT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* (80-.). 357.
- 123 Park, Y.E., Hayashi, Y.K., Goto, K., Komaki, H., Hayashi, Y., Inuzuka, T., Noguchi, S., Nonaka, I., Nishino, I., 2009. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B. *Neuromuscul. Disord.* 19, 29–36.
- 124 Pekovic, V., Harborth, J., Broers, J.L. V, Ramaekers, F.C.S., Van Engelen, B., Lammens, M., Von Zglinicki, T., Foisner, R., Hutchison, C., Markiewicz, E., 2007. Nucleoplasmic LAP2??-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 176, 163–172.
- 125 Pereira, S., Bourgeois, P., Navarro, C., Esteves-Vieira, V., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., Lévy, N., 2008. HGPS and related premature aging disorders: From genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech. Ageing Dev.* 129, 449–459.
- 126 Perepelina, K., Dmitrieva, R., Ignatieva, E., Borodkina, A., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2018. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling. *Biochem. Cell Biol.* 96, 342–348.
- 127 Perepelina, K., Klauzen, P., Kostareva, A., Malashicheva, A., 2019. Tissue-Specific Influence of Lamin A Mutations on Notch Signaling and Osteogenic Phenotype of Primary Human Mesenchymal Cells. *Cells* 8, 266.
- 128 Perepelina, K., Kostina, A., Klauzen, P., Khudiakov, A., Rabino, M., Crasto, S., Zlotina, A., Fomicheva, Y., Sergushichev, A., Oganessian, M., Dmitriev, A., Kostareva, A., Di Pasquale, E., Malashicheva, A., 2020. Generation of two iPSC lines (FAMRCi007-A and FAMRCi007-B) from patient with Emery–Dreifuss muscular dystrophy and heart rhythm abnormalities carrying genetic variant LMNA p.Arg249Gln. *Stem Cell Res.* 47, 101895.
- 129 Perepelina, K., Zaytseva, A., Khudiakov, A., Neganova, I., Vasichkina, E., Malashicheva, A., Kostareva, A., 2022. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. *Front. Cardiovasc. Med.* 932956.
- 130 Piekarowicz, K., Machowska, M., Dratkiewicz, E., Lorek, D., Madej-Pilarczyk, A., Rzepecki, R., 2017. The effect of the lamin A and its mutants on nuclear structure, cell proliferation, protein stability, and mobility in embryonic cells. *Chromosoma* 126, 501–517.
- 131 Poh, Y.C., Shevtsov, S.P., Chowdhury, F., Wu, D.C., Na, S., Dunder, M., Wang, N., 2012. Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nat. Commun.* 29;3:866.
- 132 Poleshko, A., Shah, P.P., Gupta, M., Babu, A., Morley, M.P., Manderfield, L.J., Ifkovits, J.L., Calderon, D., Aghajanian, H., Sierra-Pagán, J.E., Sun, Z., Wang, Q., Li, L., Dubois, N.C., Morrissey, E.E., Lazar, M.A., Smith, C.L., Epstein, J.A., Jain, R., 2017. Genome-Nuclear Lamina Interactions Regulate Cardiac Stem Cell Lineage Restriction. *Cell* 171, 573-587.e14.
- 133 Poleshko, A., Smith, C.L., Nguyen, S.C., Sivaramakrishnan, P., Wong, K.G., Murray, J.I., Lakadamyali, M., Joyce, E.F., Jain, R., Epstein, J.A., 2019. H3k9me2 orchestrates inheritance of spatial positioning of peripheral heterochromatin through mitosis. *Elife* 8, 1–24.
- 134 Prokocimer, M., Davidovich, M., Nissim-Rafinia, M., Wiesel-Motiuk, N., Bar, D.Z., Barkan, R., Meshorer, E., Gruenbaum, Y., 2009. Nuclear lamins: Key regulators of nuclear structure and activities. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1059–1085.

- 135 Rankin, J., Ellard, S., 2006. The laminopathies: A clinical review. *Clin. Genet.* 70, 261–274.
- 136 Ricci, M.A., Cosma, M.P., Lakadamyali, M., 2017. Super resolution imaging of chromatin in pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 46, 186–193.
- 137 Robson, M.I., de las Heras, J.I., Czapiewski, R., Lê Thành, P., Booth, D.G., Kelly, D.A., Webb, S., Kerr, A.R.W., Schirmer, E.C., 2016. Tissue-Specific Gene Repositioning by Muscle Nuclear Membrane Proteins Enhances Repression of Critical Developmental Genes during Myogenesis. *Mol. Cell* 62, 834–847.
- 138 Rønningen, T., Shah, A., Oldenburg, A.R., Vekterud, K., Delbarre, E., Moskaug, J.O., Collas, P., 2015. Prepatterning of differentiation-driven nuclear lamin A/C-associated chromatin domains by GlcNAcylated histone H2B. *Genome Res.* 25, 1825–1835.
- 139 Salvarani, N., Crasto, S., Miragoli, M., Bertero, A., Paulis, M., Kunderfranco, P., Serio, S., Forni, A., Lucarelli, C., Dal Ferro, M., Larcher, V., Sinagra, G., Vezzoni, P., Murry, C.E., Faggian, G., Condorelli, G., Di Pasquale, E., 2019. The K219T-Lamin mutation induces conduction defects through epigenetic inhibition of SCN5A in human cardiac laminopathy. *Nat. Commun.* 10, 1–16.
- 140 Sato, P.Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patiño, G.A., Taffet, S.M., Isom, L.L., Delmar, M., 2009. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* 105, 523–526.
- 141 Scaffidi, P., Misteli, T., 2008. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* 10, 452–459.
- 142 Scharner, J., Gnocchi, V.F., Ellis, J.A., Zammit, P.S., 2010. Genotype-phenotype correlations in laminopathies: How does fate translate? *Biochem. Soc. Trans.* 38, 257–262.
- 143 Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K., Just, U., 2011. The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 572–581.
- 144 Shah, P.P., Lv, W., Rhoades, J.H., Poleshko, A., Abbey, D., Caporizzo, M.A., Linares-Saldana, R., Heffler, J.G., Sayed, N., Thomas, D., Wang, Q., Stanton, L.J., Bedi, K., Morley, M.P., Cappola, T.P., Owens, A.T., Margulies, K.B., Frank, D.B., Wu, J.C., Rader, D.J., Yang, W., Prosser, B.L., Musunuru, K., Jain, R., 2021. Pathogenic LMNA variants disrupt cardiac lamina-chromatin interactions and de-repress alternative fate genes. *Cell Stem Cell* 28, 938-954.e9.
- 145 Shevelyov, Y.Y., Ulianov, S. V., 2019. The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. *Cells* 8, 136.
- 146 Shumaker, D.K., Solimando, L., Sengupta, K., Shimi, T., Adam, S.A., Grunwald, A., Strelkov, S. V., Aebi, U., Cardoso, M.C., Goldman, R.D., 2008. The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: Its role in DNA replication. *J. Cell Biol.* 181, 269–280.
- 147 Shy, D., Gillet, L., Abriel, H., 2013. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 886–894.
- 148 Smits, A.M., van Vliet, P., Metz, C.H., Korfage, T., Sluijter, J.P.G., Doevendans, P.A., Goumans, M.J., 2009. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: An in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat. Protoc.* 4, 232–243.
- 149 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., 2013. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* (80-.). 341.
- 150 Tilgner, K., Wojciechowicz, K., Jahoda, C., Hutchison, C., Markiewicz, E., 2009. Dynamic complexes of A-type lamins and emerin influence adipogenic capacity of the cell via nucleocytoplasmic distribution of β -catenin. *J. Cell Sci.* 122, 401–413.

- 151 Tong, J., Li, W., Vidal, C., Yeo, L.S., Fatkin, D., Duque, G., 2011. Lamin A/C deficiency is associated with fat infiltration of muscle and bone. *Mech. Ageing Dev.* 132, 552–559.
- 152 Tsukune, N., Naito, M., Kubota, T., Ozawa, Y., Nagao, M., Ohashi, A., Sato, S., Takahashi, T., 2017. Lamin A overexpression promotes osteoblast differentiation and calcification in the MC3T3-E1 preosteoblastic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 664–670.
- 153 Ullah, I., Subbarao, R.B., Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 35.
- 154 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., 2014. The p.R482W substitution in a-type lamins deregulates SREBP1 activity in dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2096–2109.
- 155 Van Berlo, J.H., Voncken, J.W., Kubben, N., Broers, J.L.V., Duisters, R., van Leeuwen, R.E.W., Crijns, H.J.G.M., Ramaekers, F.C.S., Hutchison, C.J., Pinto, Y.M., 2005. A-type lamins are essential for TGF- β 1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2839–2849.
- 156 Van Steensel, B., Henikoff, S., 2000. Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered Dam methyltransferase. *Nat. Biotechnol.* 18, 424–428.
- 157 Wang, T., Zhang, X., Bikle, D.D., 2017. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J. Cell. Physiol.* 232, 913–921.
- 158 Wong, X., Stewart, C.L., 2020. The Laminopathies and the Insights They Provide into the Structural and Functional Organization of the Nucleus. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 21, 263–288.
- 159 Worman, H.J., 2018. Cell signaling abnormalities in cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutations. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 37–42.
- 160 Worman, H.J., 2012. Nuclear lamins and laminopathies. *J. Pathol.* 226, 316–325.
- 161 Worman, H.J., Ostlund, C., Wang, Y., 2010. Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- 162 Wu, D., Flannery, A.R., Cai, H., Ko, E., Cao, K., 2014. Nuclear localization signal deletion mutants of lamin A and progerin reveal insights into lamin A processing and emerin targeting. *Nucl. (United States)* 5, 37–41.
- 163 Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. a, 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- 164 Zanotti, S., Canalis, E., 2016. Notch signaling and the skeleton. *Endocr. Rev.* 37, 223–253.
- 165 Zaremba-Czogalla, M., Dubińska-Magiera, M., Rzepecki, R., 2011. Laminopathies: The molecular background of the disease and the prospects for its treatment, *Cellular and Molecular Biology Letters*.
- 166 Zhang, B., Yang, Y., Keyimu, R., Hao, J., Zhao, Z., Ye, R., 2019. The role of lamin A/C in mesenchymal stem cell differentiation. *J. Physiol. Biochem.* 75, 11–18.
- 167 Zhang, H., Kieckhaefer, J.E., Cao, K., 2013. Mouse models of laminopathies. *Aging Cell* 12, 2–10.
- 168 Zhang, Y.Q., Sarge, K.D., 2008. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J. Cell Biol.* 182, 35–39.
- 169 Zuleger, N., Robson, M.I., Schirmer, E.C., 2011. The nuclear envelope as a chromatin organizer. *Nucleus.* 2, 5, 339-49.