

УДК 576.08

## РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА: СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2020 г. Л. А. Ржанова<sup>а, \*</sup>, А. В. Кузнецова<sup>а</sup>, М. А. Александрова<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: 9303923@gmail.com

Поступила в редакцию 10.01.2020 г.

После доработки 04.02.2020 г.

Принята к публикации 07.02.2020 г.

Нарушение гомеостатической и функциональной целостности сетчатки и ретиального пигментного эпителия (РПЭ) является основной причиной ряда дегенеративных заболеваний глаза человека, сопровождающихся потерей зрения. Несмотря на значительные успехи, достигнутые за последние десятилетия, в разработке новых методов лечения указанной патологии, сохраняется ряд осложнений при использовании хирургических способов коррекции зрения и пока непреодолимых ограничений в применении современных подходов, например, генной терапии и генной инженерии. Одним из перспективных подходов к лечению дегенеративных заболеваний сетчатки может оказаться подход, основанный на использовании регенеративных способностей собственных эндогенных клеток с высокой пластичностью, в частности клеток РПЭ и Мюллеровской глии. В настоящее время клетки РПЭ позвоночных вызывают огромный интерес в качестве источника новых фоторецепторов и других нейронов в деградирующей сетчатке *in vivo*. В связи с этим исследуются возможности их прямого репрограммирования генетическими, эпигенетическими, химическими методами и их комбинацией. В обзоре сделан акцент на исследованиях по генетическому прямому репрограммированию клеток РПЭ позвоночных в нейроны сетчатки, с подробным анализом используемых генов в качестве основных репрограммирующих факторов, сравнительным анализом и экстраполяцией экспериментальных данных с животных на человека. Кроме того, обзор затрагивает работы по использованию альтернативных генетическому прямому репрограммированию подходов – химически-опосредованного с применением коктейлей из терапевтических низкомолекулярных соединений и микроРНК. В целом, результаты исследований указывают на сложность процесса прямого репрограммирования клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки. Однако, учитывая результаты по прямому репрограммированию клеток позвоночных и доступность клеток РПЭ человека для различных векторов, доставляющих в клетки разнообразные молекулы: транскрипционные факторы, химерные эндонуклеазы, рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения, можно предположить наиболее оптимальный набор факторов для успешной конверсии клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки.

**Ключевые слова:** ретиальный пигментный эпителий, РПЭ, регенерация сетчатки, генетическое прямое репрограммирование, гены, транскрипционные факторы, дегенеративно-дистрофические заболевания глаза

**DOI:** 10.31857/S0475145020040060

### ВВЕДЕНИЕ. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ СЕТЧАТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА

Дегенерация сетчатки в результате гибели фоторецепторов, специализированных клеток, обеспечивающих фототрансдукцию, и ретиального пигментного эпителия (РПЭ) является основной причиной многих дегенеративно-дистрофических

заболеваний глаза человека, приводящих к потере зрения (Fu et al., 2018). В настоящее время в современной медицине для коррекции зрения при указанной патологии активно разрабатываются подходы, направленные на сохранение исходных фоторецепторов и РПЭ (Jiang et al., 2018), замену клеток путем активации эндогенной регенерации (Otterson, 2017) или за счет клеточной трансплантации (Jiang et al., 2018; Léveillard, Klipfel, 2019). Все это стало возможным благодаря развитию ря-

да технологий в клеточной и молекулярной биологии. Вследствие использования вирусных и невирусных векторов для доставки функциональных генов в дефектные клетки глаза, открытия методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а из них клеток РПЭ и нейронов сетчатки для трансплантации, а также создания CRISPR/Cas9 технологии, позволило говорить о революции, происходящей в офтальмологии (Jiang et al., 2018). Так, благодаря успехам современной биоинженерии стало возможным использовать принципы генной терапии и геномной хирургии для лечения наследственных заболеваний глаз человека (Chan et al., 2017). Основная цель — заменить нефункциональные или дефектные гены новыми полнофункциональными, чтобы уровень генетической экспрессии мог вернуться к нормальному. Первый успешный клинический пример генной терапии в офтальмологии показан у пациентов с врожденным амаврозом Лебера, вызванный мутациями в гене *RPE65* (Bainbridge et al., 2008). Клинические испытания генной терапии начаты и для пациентов с болезнью Штаргардта (clinicaltrials.gov NCT01367444), синдромом Ушера (clinicaltrials.gov NCT01505062), пигментным ретинитом (clinicaltrials.gov NCT01482195) (Fu et al., 2018). Клинические испытания генной терапии, направленной на лечение заболеваний сетчатки, показали, что она безопасна и эффективна для людей (Al-Saikhan, 2013; Öner, 2017; Fu et al., 2018; Jiang et al., 2018). Однако лечение генной терапией ограничено только аутосомно-рецессивными заболеваниями. При этом в клетках остается функционально дефектный ген, который необходимо заблокировать, сделав его не функциональным или удалить. Лечение наследственных заболеваний глаз с использованием методов хирургии генома в течение последних нескольких лет развивается быстрыми темпами. С внедрением технологии CRISPR/Cas редактирования генов, которая позволяет не только заблокировать дефектный ген, но и встроить рабочий, внимание многих исследователей направлено на восстановление сетчатки и РПЭ (Burnight et al., 2017). В ближайшее время начнутся клинические испытания CRISPR/Cas9 на людях с таким офтальмологическим заболеванием, как врожденный амавроз Лебера 10 типа (clinicaltrials.gov NCT03872479). Поскольку генная терапия и геномная хирургия имеют высокий процент эффективности только на ранних стадиях развития дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки, когда еще сохранились фоторецепторы и РПЭ, многое зависит от возможности ранней диагностики заболеваний. Кроме того, эти методы не подходят для лечения других видов патологии сетчатки.

Другой подход в лечении ряда дегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе возрастной макулярной дегенерации — это заместительная

клеточная терапия. Клетки РПЭ, полученные из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и ИПСК человека уже проходят клинические испытания и имеют большие перспективы как для лечения возрастной макулярной дистрофии (Schwartz et al., 2012; Kharitonov et al., 2018; Luo, Chen, 2018; Kashani et al., 2018), так и наследственных, связанных с РПЭ, дистрофий сетчатки (Chichagova et al., 2018). Несмотря на разработанные высокоэффективные протоколы по получению клеток РПЭ в достаточном количестве для трансплантаций, они все еще остаются трудо- и времязатратными (Kharitonov et al., 2018; Artero-Castro et al., 2019). Помимо позитивного эффекта трансплантация может вызывать ряд осложнений, которые могут быть спровоцированы хирургическим повреждением сетчатки, приводящим к ее отслоению (Satarian et al., 2017), а так же самими клетками при долгосрочном выживании/интеграции, вызывая иммуносупрессию и опухолообразование (Nguyen, Wong, 2017; Öner, 2018). В дополнение к научным проблемам остаются неразрешенными морально-этические вопросы по использованию ЭСК (Schwartz et al., 2015).

Благодаря повышенному интересу к ИПСК, возможности получения из них клеток РПЭ и нейронов сетчатки для заместительной клеточной терапии, область исследования регенеративных способностей собственных эндогенных клеток с высокой пластичностью, таких как РПЭ и Мюллеровская глия, на наш взгляд, незаслуженно оказалась в тени. Хотя очевидно, что прямое репрограммирование эндогенных клеток в нейроны сетчатки может быть перспективным для лечения многих дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки глаза человека, позволяющее избежать перечисленные выше ограничения и осложнения.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ДЛЯ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

РПЭ — это однослойный эпителий, состоящий из сильнопигментированных клеток, выполняющих жизненно важные функции в физиологии сетчатки. РПЭ лежит непосредственно под сетчаткой и образует внешний гематоретинальный барьер. Такое анатомическое расположение предоставляет уникальную возможность для прямого репрограммирования клеток РПЭ в фоторецепторы и другие нейроны и регенерации дегенерирующей сетчатки без хирургического вмешательства (Wang et al., 2010).

В процессе развития РПЭ и сетчатка происходят из одной и той же структуры — глазного пузыря (Martínez-Morales et al., 2004). Образующие его клетки нейроэпителия имеют общие молекулярные характеристики, они бипотентны, и могут

дать начало как клеткам РПЭ, так и клеткам сетчатки (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014). В процессе развития глазной пузырь инвагинирует, образуя двухслойную глазную чашу, создавая анатомическое разделение РПЭ (внешний слой) и сетчатки (внутренний слой) (Martínez-Morales et al., 2004). РПЭ сохраняет свою простую однослойную эпителиальную структуру на протяжении всей жизни. В то время как сетчатка представляет собой высоко упорядоченную структуру с пятью типами нейронов, включая ганглиозные, амакриновые, биполярные, горизонтальные и фоторецепторные клетки, и одним типом глии — клетки Мюллера (Zaghloul et al., 2005; Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014). Благодаря общности происхождения в клетках РПЭ, по всей видимости, сохраняются молекулярные и клеточные особенности, которые могут способствовать переключению их клеточной судьбы при прямом репрограммировании. Так, последние исследования (Dvorianchikova et al., 2019) показали, что клетки РПЭ глаза взрослой мыши эпигенетически очень близки к фенотипам клеток-предшественников сетчатки и фоторецепторов. На основании данных, полученных с использованием ряда специфических методов (ДНК-микрочипа (DNA microarray) и методов, основанных на иммунопреципитации хроматина и полногеномном бисульфитном секвенировании (ChIP- и whole-genome bisulfite sequencing)) авторы предположили существование как минимум двух механизмов, необходимых для запуска прямого репрограммирования клеток РПЭ в нейрональные клетки сетчатки. Первый механизм заключается в ремоделировании конденсированного хроматина, в котором находятся ключевые гены клеток-предшественников и зрелых нейронов сетчатки транскрипционными пионер-факторами. Второй механизм — в деметилировании регуляторных элементов генов, связанных с фоторецепторами (Dvorianchikova et al., 2019). Можно предположить, что именно эти механизмы запускаются в клетках РПЭ у высокорегенерирующих амфибий при регенерации сетчатки, а у млекопитающих они вероятно подавлены или отсутствуют.

Классические эксперименты на животных моделях продемонстрировали способность клеток РПЭ к трансдифференцировке, естественному прямому репрограммированию, в нейральные клетки сетчатки. Процесс трансдифференцировки клеток РПЭ в нейральные клетки у низших позвоночных успешно воспроизводится *in vivo*. Так, клетки РПЭ у ряда амфибий после повреждения сетчатки репрограммируются в клетки подобные стволовым клеткам нейроэпителия, потомки которых дифференцируются во все нервные клетки сетчатки, включая фоторецепторы, глию, пигментный эпителий и полностью восстанавливают функцию сетчатки (Chiba, Mitashov, 2008; Vergara, Del Rio-

Tsonis, 2009; Grigoryan et al., 2013; Islam et al., 2014). У птиц и млекопитающих процесс конверсии РПЭ происходит в ранние периоды эмбрионального развития только под влиянием основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Luz-Madriral et al., 2014), а у взрослых особей при усилении или потери функции генов, участвующих в определении клеточной судьбы РПЭ и сетчатки (Nguyen, Arnheiter, 2000; Bumsted, Barnstable, 2000; Martínez-Morales et al., 2003; Bäumer et al., 2003; Fujimura et al., 2009; Bassett et al., 2010; Bharti et al., 2012; Remez et al., 2017). У взрослых млекопитающих, включая человека, РПЭ может проявлять пластичность и пролиферацию. Показано, что в зрелом глазу крыс небольшая популяция клеток на периферии РПЭ поддерживает митотическую активность (Al-Hussaini et al., 2008). Клетки РПЭ, в норме находящиеся в состоянии покоя, могут повторно входить в клеточный цикл и пролиферировать при определенных состояниях, таких как отслоение сетчатки (Anderson et al., 1981), физическая стимуляция (Zhang et al., 1993), повреждение сетчатки или ее дегенерация (La Cour, 2008). Пролиферативный ответ может иметь два последствия — привести к регенерации РПЭ (Rabenlehner et al., 2008) или к пролиферативной ретинопатии, при которой клетки РПЭ трансдифференцируются в фибробластоподобные клетки, вызывающие отслоение сетчатки (Tamiya, Kaplan, 2016).

Трансдифференцировку клеток РПЭ у птиц и млекопитающих в нейроны сетчатки можно наблюдать *in vitro* при условии добавления морфогенов и факторов роста (Zhao et al., 1995; Engelhardt et al., 2005; Sakami et al., 2008; Salero et al., 2012). В культуре клетки РПЭ теряют исходные признаки, такие как пигментацию, значительно снижают экспрессию специфических маркеров RPE65, MITF, CRALBP и приобретают черты нейральных клеток по маркерам MUSASH1, NESTIN,  $\beta$ III-TUBULIN, GFAP, DOUBLECORTIN, NF 68 и 200 кДа. Наши исследования так же демонстрируют, что клетки РПЭ эмбриона и взрослого человека *in vitro* в средах с добавками морфогенов и факторов роста теряют пигментные гранулы, дедифференцируются, пролиферируют и демонстрируют маркеры нескольких типов нейральных и глиальных клеток (Milyushina et al., 2009, 2011, 2012; Kuznetsova, 2014; Kuznetsova et al., 2015, 2019). На стадии дедифференцировки клетки приобретают черты стволовых/нейроэпителиальных клеток, экспрессируя *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *OTX2*, *PAX6* и *NESTIN* (Milyushina et al., 2009, 2011, 2012; Kuznetsova et al., 2014, 2015, 2019a, 2019b). Хотя экспрессия мРНК генов-маркеров плюрипотентности проявляется на очень низком уровне в сравнении с ИПСК человека (Kuznetsova et al., 2019), активность этих генов свидетельствует, что они могут действовать, как пионер-

факторы (Kuzmich et al., 2015). Клетки РПЭ человека в условиях *in vitro* приобретают пронеуральные свойства при частичном сохранении свойств РПЭ. В культуре четко проявляется гетерогенность популяции клеток РПЭ. Так, в условиях 2D культивирования выявляются различия в характере роста клеток, в неоднородности монослоя: клетки различаются по размеру, форме, степени пигментации и количеству ядер, а также в формировании колоний – клетки образуют как плотно упакованные эпителиоидные колонии с различной морфологией, так и “рыхлые” колонии с размытыми границами, что отражает происходящую клональную пролиферацию клеток (Kuznetsova et al., 2011). В условиях 3D культивирования (в коллагеновом геле, на бесклеточном каркасе сетчатки) гетерогенность клеток РПЭ проявляется в разделении на две схожие по морфологии и однотипные по поведению субпопуляции клеток: одна субпопуляция клеток мигрирует на поверхность плотного субстрата, другая образует сфероподобные структуры из агрегированных клеток (Kuznetsova, Aleksandrova, 2017). При этом субпопуляция, сохраняющая способность к образованию плотного монослоя и редифференцировке РПЭ, может оказывать благоприятный эффект при трансплантации, тогда как вторая субпопуляция, образующая клеточные агрегаты, может оказывать тракционное действие на окружающие ткани, что неблагоприятно при трансплантации. Такие особенности гетерогенности клеток РПЭ следует учитывать при его использовании в тканевой инженерии.

Наряду с этим, из патоморфологических исследований хорошо известно, что в глазах человека иногда обнаруживаются хрящевые и костные образования, которые развиваются из клеток РПЭ (Frayer, 1966; Tso, Fine, 1979; Salero et al., 2012). В условиях культуры клетки РПЭ под влиянием специфических индукторов проявляют признаки не только нейральной, но и гладкомышечной, адипо-, хондро- и остеогенной дифференцировки. По мнению ряда авторов, клетки РПЭ в определенных условиях могут становиться “мультипотентными стволовыми клетками”, способными продуцировать клетки и нейрального и мезенхимального фенотипов (Milyushina et al., 2012; Salero et al., 2012). Способность к множественным дифференцировкам подчеркивает интерес к чрезвычайно высокой пластичности клеток РПЭ и ставит задачу поиска механизмов, которые ее определяют и факторов для регуляции направленной дифференцировки.

Анализ представленных работ свидетельствует о том, что клетки РПЭ млекопитающих и человека по анатомическим, генетическим и эпигенетическим характеристикам, по особенностям происхождения, эволюционному наследству, по способностям к дедифференцировке, пролиферации

и пластичности представляют огромный интерес в качестве источника новых фоторецепторов и других нейронов в деградирующей сетчатке. Однако кратковременный характер проявления клетками РПЭ взрослого человека *in vitro* пронеуральных свойств инициировал исследования по поиску возможностей прямого репрограммирования РПЭ с использованием генетических, эпигенетических и химических методов воздействия, речь о которых и пойдет ниже.

### ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Генетические программы являются основными движущими силами развития сетчатки, которые координируют пролиферацию и выход клеток из клеточного цикла, определяют клеточные судьбы, контролируют количество клеток и управляют клеточным созреванием (Reese, Keeley, 2016). В основе дифференцировки или репрограммирования любых клеток лежат процессы распознавания и активации молчащих генов. Эти процессы происходят в результате совместного действия так называемых первичных, пионерских или пионер-фактор транскрипции с каноническими транскрипционными факторами (Kuzmich et al., 2015; Mayran et al., 2019). При репрограммировании клеток обычно используется комбинация транскрипционных факторов, часть из которых являются пионер-факторами. Так, при получении функциональных глутаминергических нейронов из фибробластов мыши при помощи трех факторов транскрипции ASCL1, BRN2 и MYT1L (Vierbuchen et al., 2010), оказалось, что именно ASCL1 играет центральную роль в инициации прямого репрограммирования, поскольку его одного достаточно для индукции фибробластов в незрелые нейральные клетки, а BRN2 и MYT1L – нет. Таким образом, ASCL1 является транскрипционным пионер-фактором в нейрональном прямом репрограммировании фибробластов (Iwafuchi-Doi, Zaret, 2014). При репрограммировании фибробластов в ИПСК OCT3/4, SOX2, и/или KLF4 действуют как пионер-факторы, в отличие от c-MYC (Iwafuchi-Doi, Zaret, 2014; Kuzmich et al., 2015). Следовательно, для успешного генетического прямого репрограммирования клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки необходимо определить пионерские факторы, без которых этот процесс не осуществим, и дополнительные, канонические факторы, которые будут продвигать клеточную конверсию после инициации процесса.

Современные методы генной инженерии, используя пути усиления или подавления функции генов, участвующих в определении клеточной судьбы РПЭ и сетчатки, создали возможность прямого репрограммирования клеток РПЭ у мле-

копитающих. Исследователи департамента офтальмологии Университета Алабамы и медицинского факультета Бирмингема США, а так же другие группы исследователей показали, что клетки РПЭ птицы, мышей и человека можно напрямую репрограммировать воздействием различных генов, которые участвуют в процессе дифференцировки сетчатки *in vivo* и *in vitro* (Mathers et al., 1997; Yan, Wang, 1998; Toy et al., 1998b; Loosli et al., 1999; Bernier et al., 2000a; Lagutin et al., 2001; Yan et al., 2001, 2010, 2013a, 2013b, 2015; Azuma et al., 2005; Liang et al., 2008; Ma et al., 2009a; Li et al., 2010; Wang et al., 2010; Wang, Yan, 2014; Kole et al., 2018). В табл. 1 представлены гены, необходимые для развития глаза и сетчатки, использованные в экспериментах по генетическому прямому репрограммированию клеток РПЭ и другие клетки позвоночных и человека в нейроны сетчатки. Для этого исследуемые гены при помощи вирусных векторов доставляли в клетки позвоночных и человека *in vivo* и *in vitro*. Транскрипционные факторы, участвующие в определении клеточной судьбы РПЭ и сетчатки – это гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы, которые кодируются гомеобоксными генами (англ. homeobox). Их можно условно разделить на факторы первичной индукции – факторы глазного поля и факторы клеточной специализации и дифференцировки, относящиеся в основном к семейству с базовым структурным мотивом спираль–петля–спираль (англ. basic helix-loop-helix, bHLH) (Zagozewski et al., 2014).

**Роль транскрипционных факторов первичной индукции сетчатки в прямом репрограммировании.** Транскрипционные факторы первичной индукции клеток сетчатки PAX6, CHX10, RAX, SIX3, SIX6, OTX2, CRX, которые относятся к региональным факторам транскрипции глазного поля, необходимы для определения судьбы клеток-предшественников и для терминальной дифференцировки некоторых типов клеток сетчатки (Zagozewski et al., 2014). Влияние этих факторов на прямое репрограммирование клеток нейрального происхождения в нейроны сетчатки были изучены в ряде работ на позвоночных животных (Mathers et al., 1997; Toy et al., 1998b; Loosli et al., 1999; Bernier et al., 2000a; Lagutin et al., 2001; Azuma et al., 2005; Yan et al., 2010; Kole et al., 2018). Так, в работе (Azuma et al., 2005) показано, что одного гена PAX6 достаточно, чтобы вызвать прямое репрограммирование клеток РПЭ куриного эмбриона (лат. *Gallus domesticus*) в нейроны сетчатки. Авторы при помощи плазмиды, несущей кДНК PAX6 человека, индуцировали прямое репрограммирование клеток РПЭ птицы *in ovo* с образованием полноценной эктопической сетчатки. Несмотря на это, другие исследователи (Yan et al., 2010), считают PAX6 “неэффективным” геном для прямого репрограммирования клеток РПЭ в нейральные клетки

сетчатки, поскольку они в своих экспериментах такового не наблюдали.

Дополнительная сетчатка или сетчаткоподобные структуры также образуются при эктопической экспрессии других факторов транскрипции глазного поля. Так, эктопическая экспрессия SIX3 или SIX6 (известный так же, как OPTX2) индуцировала гиперплазию сетчатки и образование эктопической зрительно-везикулярной или сетчаткоподобной структуры в мозге рыбы японской медаки (лат. *Oryzias latipes*), у шпорцевой лягушки (лат. *Xenopus*) и у эмбрионов мышей (лат. *Muridae*) (Loosli et al., 1999; Bernier et al., 2000a; Lagutin et al., 2001). Авторы указывают, что SIX3/SIX6 индуцирует, но не полностью реализует более поздние стадии развития клеток сетчатки. Эктопическая экспрессия SIX6 в эмбриональных или зрелых клетках РПЭ курицы также конвертирует их к нейрональной морфологии и экспрессии маркеров, характерных для развивающихся нейронов сетчатки (Toy et al., 1998b). Эмбрионы шпорцевой лягушки, инъецированные синтетическим РНК RX, но не PAX6 и OTX2, развивают эктопическую ткань сетчатки и РПЭ (Mathers et al., 1997). Однако получить полностью структурированную сетчатку путем прямого репрограммирования РПЭ генами SIX3/SIX6 в этих экспериментах не удалось.

Одним из ключевых гомеобокс-содержащим фактором является OTX2, который регулирует начальную спецификацию фоторецепторов и РПЭ (Karali, Banfi, 2015). Так было показано, что при трансфекции OTX2 ретинальных стволовых клеток (РСК) человека происходит их дифференцировка в фоторецепторы *in vitro* (Inoue et al., 2010). Однако, Кол с коллегами показали (Kole et al., 2018), что в клетках РПЭ, полученных из ИПСК человека, эктопическая экспрессия OTX2 усиливала активности промоторов генов, которые подавляются при дедифференцировке клеток РПЭ *in vitro*, тем самым способствуя восстановлению и сохранению исходного фенотипа РПЭ, и не индуцирует процесс прямого репрограммирования этих клеток в фоторецепторы сетчатки (см. рис. 1). Эти результаты, по мнению авторов, а так же (Fisher, Ferrington, 2018), имеют определенную значимость, поскольку поддержание клеток РПЭ у пациентов с ретинопатиями, связанными с функционально дефектным РПЭ (например, возрастная макулярная дистрофия), поможет восстановлению функций фоторецепторов, поскольку РПЭ и фоторецепторы – это единая функциональная единица в сетчатке (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014).

Отрицательные результаты были получены при прямом репрограммировании других клеток глаза человека (пигментного эпителия радужки, клеток Мюллеровской глии и цилиарного тела) в фоторецепторы при вирусной трансфекции SIX3, PAX6, RX и CRX (Seko et al., 2012). Авторы показа-

Таблица 1. Гены факторов транскрипции, используемые при прямом репрограммировании соматических клеток позвоночных в клетки сетчатки

Вид	Исходные клетки	Факторы транскрипции	<i>In vivo/in vitro/in situ</i>	Характеристики клеток	I/II роль	Ссылки
Транскрипционные факторы первичной индукции клеток сетчатки						
Шпорцевая лягушка (лат. <i>Xenopus</i> )	Нервная пластинка	<i>RX</i>	<i>In vivo</i>	Эктопическая сетчатка и РПЭ	I	(Mathers et al., 1997)
	Нервная пластинка	<i>SIX3</i> или <i>SIX6</i>	<i>In vivo</i>	Гиперплазия сетчатки и уменьшение РПЭ. Эктопические зрительно-везикулярные сетчаткоподобные структуры в среднем и заднем головном мозге. Нарушает развитие нормального глаза	I	(Bernier et al., 2000b)
Японская медака (лат. <i>Oryzias latipes</i> )	Нервная пластинка	<i>SIX3</i>	<i>In vivo</i>	Гиперплазия сетчатки. Эктопические зрительно-везикулярные сетчаткоподобные структуры в головном мозге. Иницирует, но не реализует поздние стадии развития сетчатки	I	(Loosli et al., 1999)
	Клетки мозга	<i>SIX3</i> или <i>SIX6</i>	<i>In vivo</i>	Эктопические зрительно-везикулярные сетчаткоподобные структуры	I	(Lagutin et al., 2001)
Мышь (лат. <i>Mus musculus</i> )	РПЭ	<i>SIX6</i>	<i>In vivo</i>	Нейрональная морфология и экспрессия маркеров	I	(Toy et al., 1998a)
	РПЭ	<i>Pax6</i>	<i>In vivo</i>	Полноценная эктопическая сетчатка	I	(Azuma et al., 2005)
Курица (лат. <i>Gallus domesticus</i> )	РПЭ	<i>Pax6</i>	<i>In vitro</i>	Неструктурированная эктопическая сетчатка	I	(Yan et al., 2010)
		<i>SIX 3</i>				
		<i>SIX6</i>				
		<i>CRX</i>				
		<i>SIX9</i>				
		<i>OTX2</i>				
Человек (лат. <i>Homo sapiens</i> )	РПЭ	<i>OTX2</i>	<i>In vitro/in situ</i>	Восстановление фенотипа РПЭ	II	(Kole et al., 2018)
		<i>PAX6</i>	<i>In vitro</i>	Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки	II	(Inoue et al., 2010)
		<i>CHX10</i>				
		<i>CHX10VP16</i>				
		<i>SIX 3</i>				
		Ретинальные стволовые клетки	<i>CRX</i>	<i>In vitro</i>	Стимулируют прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки	I
<i>OTX2</i>						

Таблица 1. Продолжение

Вид	Исходные клетки	Факторы транскрипции	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Характеристики клеток	I/II роль	Ссылки
Человек (лат. <i>Homo sapiens</i> )	Цилиарное тело	<i>SIX3</i>	<i>In vitro</i>	Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки	II	(Seko et al., 2012)
		<i>PAX6</i>				
		<i>CRX</i>				
		<i>CRX</i>				
		<i>RX</i>				
		<i>SIX3</i>				
	Клетки Мюллеровской глиии	<i>PAX6</i>	<i>In vitro</i>	Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки	II	(Seko et al., 2012)
		<i>CRX</i>				
		<i>CRX</i>				
		<i>CRX</i>				
		<i>RX</i>				
		<i>SIX3</i>				
Радужка	<i>PAX6</i>	<i>In vitro</i>	Не влияют на прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы сетчатки	II	(Seko et al., 2012)	
	<i>CRX</i>					
	<i>CRX</i>					
	<i>CRX</i>					
	<i>RX</i>					
	<i>SIX3</i>					
Транскрипционные факторы клеточной специализации и дифференцировки клеток сетчатки						
Курица (лат. <i>Gallus domesticus</i> )	РПЭ	<i>NEUROD</i>	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные, клетки ганглиозного слоя и амариновые клетки сетчатки	I	(Yan, Wang, 1998; Liang et al., 2006, 2008)
		<i>NGN1</i>	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные клетки, и другие нейроны сетчатки	I	(Liang et al., 2006; Li et al., 2010; Yan et al., 2010; Wang, Yan, 2014)
		<i>NGN2</i>	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные, клетки ганглиозного слоя и амариновые клетки сетчатки	I	(Yan et al., 2001; Liang et al., 2006)
		<i>NGN3</i>	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Морфологически, молекулярно и функционально пологенные фоторецепторные, клетки ганглиозного слоя и амариновые клетки сетчатки	I	(Liang et al., 2006; Ma et al., 2009b; Li et al., 2010; Yan et al., 2010; Wang, Yan, 2014)

Таблица 1. Продолжение

Вид	Исходные клетки	Факторы транскрипции	<i>In vivo/in vitro/in situ</i>	Характеристики клеток	I/II роль	Ссылки
Курица (лат. <i>Gallus domesticus</i> )	РПЭ	<i>SOX2</i>	<i>In vivo/in vitro</i>	Морфологически, молекулярно и функционально пологонные клетки ганглиозного слоя и амакриновые клетки сетчатки	I	(Ma et al., 2009a)
		<i>NSCL1</i>	<i>In vitro</i>	Единичные маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки	II	(Ma et al., 2004)
		<i>NSCL2</i>	<i>In vivo</i>	Деградиация клеток Мюллеровской глии сетчатки	II	(Ma et al., 2009a)
		<i>ASH1</i>	<i>In vivo/in vitro</i>	Молекулярные и морфологические маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки, амакриновых и горизонтальных клеток сетчатки	I	(Mao et al., 2008; Li et al., 2010)
		<i>ATH3</i>	<i>In vivo/in vitro</i>	Не способствует генезу биполярных клеток сетчатки	II	(Yan et al., 2010)
Мышь (лат. <i>Mus musculus</i> )	РПЭ	<i>ATH5</i>	<i>In vitro</i>	Маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки	I	(Ma et al., 2004)
		<i>NGN1</i>	<i>In vivo/in vitro</i>	<i>In vitro</i> 30% клеток несут маркеры нейральных клеток сетчатки, 20% демонстрируют с морфологией фоторецепторных клеток. Эктопическая сетчатка	I	(Yan et al., 2013a)
		<i>NGN3</i>	<i>In vitro/in situ</i>	Эктопическая сетчатка	I	(Yan et al., 2013a, 2013b; Wang, Yan, 2014)
		<i>ASH1</i> <i>NGN2</i>	<i>In vitro</i>	Морфология и маркеры нейронов. Синаптическое созревание. Функциональная электрофизиология	I	(Chouchane et al., 2017)
		<i>ASCL1</i>	<i>In vivo/in vitro/in situ</i>	Морфология и молекулярные маркеры фоторецепторных, амакриновых клеток с доминированием маркеров биполярных клеток. Ответы на различные транскриптеры. Интеграция в сетчатку	I	(Pollak et al., 2013; Ueki et al., 2015; Jorstad et al., 2017; Guimarães et al., 2018)
Свинья (лат. <i>Sus scrofa domesticus</i> )	РПЭ	<i>NGN2</i>	<i>In vitro</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры фоторецепторных, амакриновых и клеток ганглиозного слоя сетчатки	I	(Guimarães et al., 2018)
		<i>NRL</i>	<i>In vivo</i>	Преобразование колбочек в палочки	I	(Montana et al., 2013)
		<i>NEUROD</i>	<i>In vitro</i>	Морфологические и молекулярные маркеры фоторецепторных клеток	I	(Yan et al., 2013a)



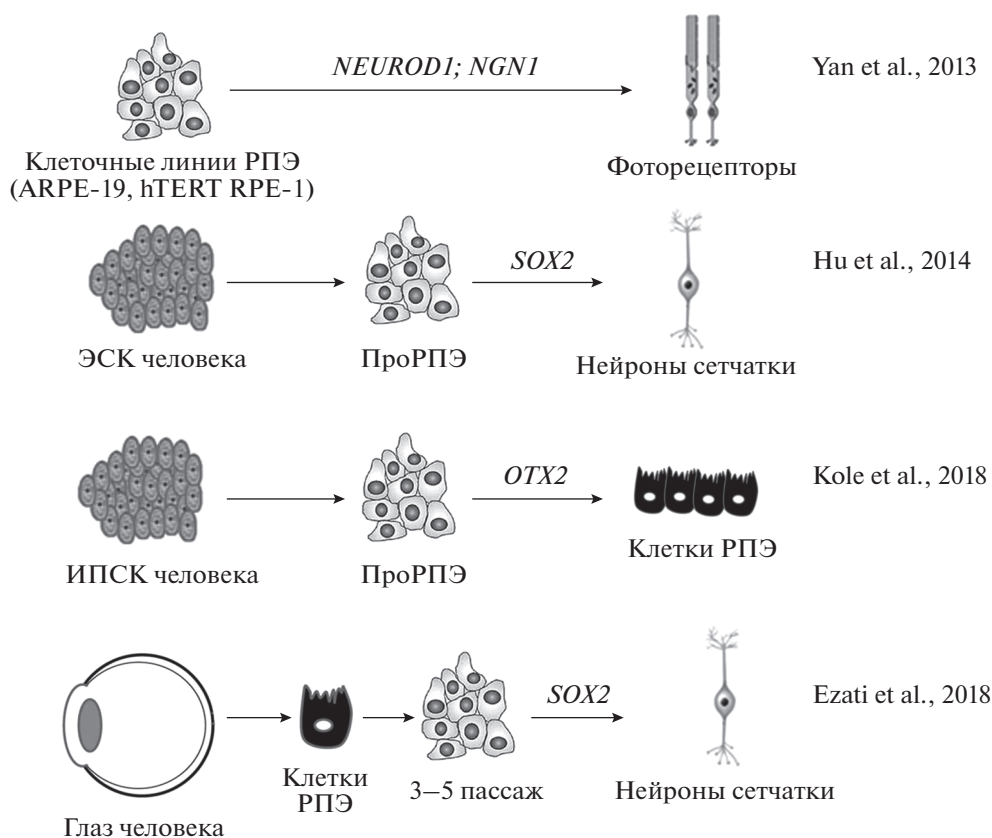
Таблица 1. Продолжение

Вид	Исходные клетки	Факторы транскрипции	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Характеристики клеток	I/II роль	Ссылки	
Человек (лат. <i>Homo sapiens</i> )	РПЭ	<i>SOX2</i>	<i>In vitro</i>	Повышение экспрессии нейральных и глиальных маркеров. Отсутствие ГАМК-эргических нейронов. Нет синаптических механизмов	I	(Hu et al., 2014; Ezati et al., 2018)	
	ИТЕРТ-RPE1	<i>NEUROD</i>	<i>In vitro</i>	30% клеток с молекулярными и морфологическими маркерами фоторецепторных клеток сетчатки	I	(Yan et al., 2013a)	
		<i>NGN1</i>					
	ARPE19	<i>NGN1</i>	<i>In vitro</i>	10% клеток с молекулярными и морфологическими маркерами фоторецепторных клеток сетчатки	I	(Yan et al., 2013a)	
	Ретинальные стволовые клетки		<i>CHX10/VP16</i>	<i>In vitro</i>	Индусируют прямое репрограммирование фоторецепторных клеток сетчатки	I	(Inoue et al., 2010)
			<i>OTX2</i>				
			<i>CRX</i>				
	Цилиарное тело		<i>NEUROD</i>	<i>In vitro</i>	Не индуцируют прямое репрограммирование в фоторецепторные клетки сетчатки	II	(Seko et al., 2012)
			<i>NRL</i>				
	Клетки Мюллеровской глиии		<i>NEUROD</i>	<i>In vitro</i>	Не индуцируют прямое репрограммирование в фоторецепторные клетки сетчатки	II	(Seko et al., 2012)
<i>NRL</i>							
РаДУЖКА		<i>NEUROD</i> <i>NRL</i>	<i>In vitro</i>	Не индуцируют прямое репрограммирование в фоторецепторные клетки сетчатки	II	(Seko et al., 2012)	
<i>Комбинации различных генов транскрипционных факторов и других факторов</i>							
Курица (лат. <i>Gallus domesticus</i> )	РПЭ	<i>ATH5</i> <i>bFGF</i>	<i>In vitro</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры клеток ганглиозных клеток сетчатки	<i>ATH5</i>	(Ma et al., 2004)	
		<i>ASH1, ATH3, CHX10</i>	<i>In vitro</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры биполярных клеток сетчатки	<i>ASCL1</i>	(Yan et al., 2010)	
Мышь (лат. <i>Mus musculus</i> )	Клетки Мюллеровской глиии	<i>ASCL1, TSA, Травма</i>	<i>In vivo</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры биполярных и клеток ганглиозного слоя сетчатки, с функциональной интеграцией в сетчатку	<i>ASCL1</i>	(Jorstad et al., 2017)	
		<i>NGN2</i> <i>FGF2</i> <i>EGF</i>	<i>In vivo</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры фоторецепторных, амакриновых и клеток ганглиозного слоя сетчатки	<i>NGN2</i>	(Guimarães et al., 2018)	

Таблица 1. Окончание

Вид	Исходные клетки	Факторы транскрипции	<i>In vivo/ in vitro/ in situ</i>	Характеристики клеток	I/II роль	Ссылки	
Мышь (лат. <i>Mus musculus</i> )	ИПСК	<i>MATH5</i> <i>DART</i> <i>DKK1</i> <i>NOGGIN</i>	<i>In vitro/ in situ</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки. При трансплантации в глаз индуцированные клетки выжили, но не прижились	<i>MATH5</i>	(Chen et al., 2010)	
		<i>SHX10VP16</i> , <i>OTX2</i> и <i>CRX</i>	<i>In vitro/ in situ</i>	Функциональные фоторецепторные клетки сетчатки, способные интегрировать в ткань реципиента и устанавливать синапсы с биполярными клетками	<i>OTX2</i> и <i>CRX</i>	(Inoue et al., 2010)	
	Цилиарное тело	<i>SIX3</i> , <i>PAX6</i> , <i>CRX</i> и <i>RX</i>	<i>In vitro</i>	Фоторецепторные клетки без наружных сегментов и механизмов транслукции	<i>CRX</i> , <i>RX</i>	(Seko et al., 2012)	
		<i>SIX3</i> , <i>PAX6</i> , <i>CRX</i> и <i>RX</i>	<i>In vitro</i>	Фоторецепторные клетки без наружных сегментов и механизмов транслукции	<i>CRX</i> , <i>RX</i>	(Seko et al., 2012)	
	Радужка	<i>SIX3</i> , <i>PAX6</i> , <i>CRX</i> и <i>RX</i>	<i>In vitro</i>	Фоторецепторные клетки без наружных сегментов и механизмов транслукции	<i>CRX</i> , <i>RX</i>	(Seko et al., 2012)	
		<i>CRX</i> , <i>RX</i> и <i>NEUROD1</i>	<i>In vitro</i>	Морфологические и молекулярные маркеры нейрональных клеток. Функциональная электрофизиология	<i>CRX</i> , <i>RX</i>	(Seko et al., 2012)	
	Человек (лат. <i>Homo sapiens</i> )	Фибробласты	<i>ASCL1</i> , <i>BRN2</i> ( <i>POU3F2</i> ), <i>MYTIL</i>	<i>In vitro</i>	Индуцированные функциональные нейроны	<i>ASCL1</i>	(Vierbuchen et al., 2010)
			<i>NEUROD</i> , <i>ASCL1</i> и <i>MYTIL</i> miR-9/9, miR-124	<i>In vitro</i>	Нейральные клетки с основными функциональными свойствами нейронов, включая образование синапсов	<i>ASCL1</i>	(Yoo et al., 2011)
		ИПСК	<i>CRX</i> , <i>RAX</i> , <i>NEUROD1</i> и <i>OTX2</i>	<i>In vitro</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры фоторецепторных клеток	<i>CRX</i> , <i>RX</i>	(Seko et al., 2014)
			<i>ATOH7</i> ( <i>MATH5</i> ) <i>DART</i> <i>DKK1</i> <i>LEFTY A</i> , <i>NOGGIN</i>	<i>In vitro</i>	Молекулярные, морфологические и физиологические маркеры клеток ганглиозного слоя сетчатки	<i>ATOH7</i> ( <i>MATH5</i> )	(Deng et al., 2016)

I – транскрипционный пионер-фактор, II – канонический транскрипционный фактор.



**Рис. 1.** Схематическое изображение генетического прямого репрограммирования клеток РПЭ человека, полученных из различных источников, в клетки сетчатки и РПЭ. РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

ли, что ни один ген из этого ряда в одиночку при его экзогенной экспрессии не индуцирует образование фоторецепторных фенотипов в исследуемых клетках *in vitro* (Seko et al., 2012). Однако, трансфекция *OTX2* и *CRX* в одиночку вызывала прямое репрограммирование РСК человека в фоторецепторы *in vitro* (Inoue et al., 2010). Такую разницу в эффективности прямого репрограммирования можно объяснить тем, что более специализированные клетки (пигментный эпителий радужки, клетки Мюллеровской глии и цилиарного тела) гораздо устойчивы к прямому репрограммированию, чем менее специализированные РСК (Pasque et al., 2011).

Интересно, что основные тканеспецифические гомеобоксные гены, находящиеся на вершине генной регуляторной сети развития глаза и/или нейральной сетчатки, показали незначительную активность в прямом репрограммировании РПЭ позвоночных в нейроны сетчатки (Yan et al., 2010). Под влиянием этих факторов не происходило формирования структурированной полноценной сетчатки. Ян с коллегами (Yan et al., 2010) отнесли эти транскрипционные факторы к “неэффективным” факторам прямого репрограммирования

клеток РПЭ в нейроны сетчатки. Эту “неэффективность” генов глазного поля в прямом репрограммировании клеток глаза, вероятно, можно объяснить общим происхождением РПЭ и сетчатки из клеток-предшественников с одинаковым паттерном экспрессии генов глазного поля. Инициация процесса их разделения происходит под эпигенетическим влиянием сигнальных молекул, синтезируемых тканями окружающими глазной пузырь, покровной эктодермой и мезенхимой, что приводит к включению узкоспециализированных генов, например, относящихся к семейству bHLH в клетках-предшественниках нейральной сетчатки и *MITF*, *TYR*, *TRP1*, *RPE65*, *CRBP*, *CRALBP*, *PITX2* в РПЭ (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2014; Zagowski et al., 2014).

Таким образом, анализ литературы по прямому репрограммированию клеток РПЭ амфибий, птиц и млекопитающих в нейроны сетчатки с использованием эктопической экспрессии генов глазного поля показал инициацию процесса клеточной конверсии, что указывает на их роль в качестве пионерских факторов. Поскольку у человека факторы глазного поля не индуцируют прямое репрограммирование клеток РПЭ в нейроны

сетчатки, можно предположить, что они либо не требуются в качестве первооткрывателей в этом процессе, либо они относятся к пассивным первичным факторам, которые ремоделируют хроматин, делая его доступным для других транскрипционных факторов, но сами не влияют на транскрипцию генов (Kuzmich et al., 2015). Кроме того, учитывая тот факт, что некоторые гены глазного поля экспрессируются в постнатальных клетках РПЭ человека, например *PAX6*, *OTX2*, *RX*, *LHX2* (Milyushina et al., 2012; Salero et al., 2012), экзогенная экспрессия этих генов в прямом репрограммировании, возможно, не требуется, и поэтому ожидаемого результата прямого репрограммирования под действием этих генов не наблюдается (Masserdotti et al., 2016).

**Роль факторов клеточной специализации и дифференцировки клеток сетчатки в прямом репрограммировании.** Факторы клеточной специализации и дифференцировки, это гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы, относящиеся к семейству bHLH, и к семейству Forkhead box (FOX) которые работают совместно, определяя судьбу клеток сетчатки (Zagozewski et al., 2014).

Влияние генов семейства bHLH на способность клеток РПЭ позвоночных к прямому репрограммированию в нейроны сетчатки изучено во многих работах (Yan, Wang, 1998; Yan et al., 2001, 2010, 2013a, 2013b, 2015; Liang et al., 2008; Ma et al., 2009a; Li et al., 2010; Wang et al., 2010; Wang, Yan, 2014). Результаты этих исследований показывают, что транскрипционные факторы семейства bHLH: *NEUROD*, *NGN1*, *NGN2* и *NGN3*, могут эффективно напрямую репрограммировать дифференцированные клетки РПЭ куриного эмбриона в диссоциированных культурах и эксплантатах в клетки с молекулярными, морфологическими и физиологическими свойствами молодых фоторецепторных клеток с небольшими фракциями других типов нейронов сетчатки (Yan, Wang, 1998; Yan et al., 2001, 2009, 2010; Liang et al., 2008; Li et al., 2010; Wang et al., 2010; Wang, Yan, 2014). При трансплантации в глаза развивающихся цыплят конвертированные *in vitro* клетки РПЭ продолжают развиваться в фоторецепторном направлении. Некоторые из трансплантированных клеток интегрируют в наружный ядерный слой сетчатки и встраиваются в функциональную сеть нейронов хозяина (Liang et al., 2006). В дополнение к этому показано, что клетки РПЭ курицы могут быть напрямую репрограммированы *in situ* (Li et al., 2010). В глазах куриных эмбрионов клетки РПЭ, измененные при помощи *NGN1*, *NGN2* и *NGN3*, демонстрировали молекулярные и морфологические маркеры фоторецепторных, ганглиозных и амакриновых клеток (Yan et al., 2001, 2010). У трансгенных мышей, экспрессирующих *NGN1* или *NGN3* описано возникновение эктопической сетчаткоподобной ткани, которая распо-

лагалась в сосудистой оболочке, около цилиарного тела, в зрительном нерве, а также в субретинальном пространстве (Yan et al., 2009; Wang, Yan, 2014). Интересно, что клетки дополнительного эктопического наружного ядерного слоя имели молекулярные и морфологические признаки фоторецепторов, подобно нормальным клеткам сетчатки, но их пространственная ориентация относительно слоя РПЭ была нарушена. Клетки эктопической сетчатки, расположенные во внутреннем ядерном слое, экспрессировали маркеры амакриновых и биполярных клеток, тогда как, находящиеся в слое ганглиозных клеток – маркер ганглиозных клеток (Yan et al., 2013b). Подобное прямое репрограммирование происходит в клетках РПЭ первичных культур ювенильных свиней, мышей и в клетках иммортализованных линий РПЭ человека (Yan et al., 2013a). Так с помощью вирусных конструкций, несущих гены *NEUROD* и *NGN1*, показано, что при эктопической экспрессии *NEUROD* в клеточной линии hTERT RPE-1<sup>1</sup> около 30% конвертированных клеток РПЭ демонстрируют молекулярные и морфологические маркеры молодых фоторецепторных клеток и количество их увеличивается до 50% при эктопической экспрессии *NGN1* (Yan et al., 2013a). В то же время, в клеточной линии ARPE-19<sup>2</sup> количество клеток, подвергшихся изменению в фоторецепторы, достигало лишь 10% (Yan et al., 2013a). Эту разницу в эффективности прямого репрограммирования клеточных линий РПЭ человека можно объяснить эпигенетической памятью, которая сохранилась от донорских клеток (Kim, Costello, 2017). Так линия ARPE-19 представлена наиболее эпигенетическими дифференцированными клетками (Dunn et al., 1996; Kim, Costello, 2017). Тем не менее, полученные результаты (Yan et al., 2013a) демонстрируют, что клетки РПЭ человека способны к прямому репрограммированию под влиянием эктопической экспрессии генов *NEUROD1* и *NGN1*. Однако при прямом репрограммировании клеток других тканей глаза человека (радужки, клеток Мюллеровской глии, цилиарного тела) под влиянием эктопической экспрессии *NEUROD1*, *NGN2* образование фоторецепторных клеток не наблюдалось (Seko et al., 2012). Можно предположить, что для клеток РПЭ человека транскрипционные факторы *NEUROD1* и *NGN1* могут выступать как мастер-гены или пионер-факторы. Возможно, это указывает на эпигенети-

<sup>1</sup> Клеточная линия hTERT RPE-1 получена путем трансфекции клеточной линии RPE-340 плазмидой, экспрессирующей каталитическую субъединицу теломеразы человека (Rambhatla et al., 2002). Клеточная линия RPE-340 получена от девочки 1-ого года жизни, умершей от травм (Matsunaga et al., 1999).

<sup>2</sup> ARPE-19 получена Aotaki-Keen в 1986 г от 19-летнего мужчины, умершего от травмы головы после ДТП (Dunn et al., 1996).

ческую доступность ДНК клеток РПЭ для этих факторов, которая возникла в ходе развития и сохраняется во взрослом состоянии под влиянием эндогенной экспрессии генов глазного поля, выступающих как пассивные пионерские факторы.

Другой высокопластичный тип клеток сетчатки — глиальные клетки Мюллера — также обладает внутренней способностью к прямому репрограммированию. В исследовании (Guimarães et al., 2018) показано, что клетки ганглиозного слоя сетчатки у мышей можно получить из постнатальных клеток Мюллеровской глии посредством сверхэкспрессии *NGN2*. Эктопическая экспрессия *NGN2* способствовала продукции пула нейронов с экспрессией генов фоторецепторов, амакриновых клеток и клеток ганглиозного слоя. Авторы также показали, что присутствие митогенных факторов, таких как EGF или bFGF, стимулирующих пролиферацию клеток Мюллеровской глии мыши, повышало эффективность прямого репрограммирования (Guimarães et al., 2018). Пролиферация — это один из пассивных способов снятия метилирование ДНК, эпигенетической памяти, в результате которого возрастает эффективность прямого репрограммирования (Masserdotti et al., 2016; Kim, Costello, 2017).

В работах (Pollak et al., 2013; Ueki et al., 2015) показано, что вирусная экспрессия *ASCL1*, другого представителя семейства транскрипционных факторов bHLH, достаточна для активации нейрогенной программы в клетках Мюллеровской глии млекопитающих (мышей), как в диссоциированных культурах *in vitro*, так и в интактной сетчатке *in vivo*. Эктопическая экспрессия транскрипционного фактора *ASCL1* стимулирует процесс прямого репрограммирования потомков клеток Мюллеровской глии в фоторецепторы, амакриновые и биполярные клетки после повреждения *in vivo* (Ueki et al., 2015). Это согласуется с ролью *ASCL1* в нормальном развитии, где известно, что *ASCL1* экспрессируется в поздних предшественниках, которые дают амакриновые, биполярные клетки и фоторецепторы, но не ганглиозные клетки, а делеция *ASCL1* у мышей приводит к снижению числа биполярных клеток и фоторецепторов (Brzezinski et al., 2011).

Другой представитель семейства транскрипционных факторов bHLH *ASH1* (*MASH1*) необходим в развитии для производства поздних нейронов, в том числе палочек фоторецепторов и биполярных клеток у мышей (Tomita et al., 1996). Трансгенная экспрессия *ASH1* инициирует нейрогенез сетчатки в слое РПЭ у мышей *in vivo* (Lanning et al., 2005). У курицы временная и пространственная экспрессия *ASH1* совпадает с гнезом амакриновых клеток (Jasoni et al., 1994), а сверхэкспрессия *ASH1* увеличивает популяцию этих клеток (Mao et al., 2009). В работе (Mao et al., 2008) на молекулярном, морфологическом и фи-

зиологическом уровнях показано, что *ASH1* может напрямую репрограммировать клетки РПЭ в сторону нейронов сетчатки *in vitro*, а в работе (Li et al., 2010) — *in vivo*. Однако отмечено, что в РПЭ куриных эмбрионов, инфицированных *RCAS-ASH1*, не происходит прямое репрограммирование клеток в фоторецепторы (Li et al., 2010). Кроме того, эти же исследователи считают, что совместная эктопическая экспрессия *ASH1*, *ATH3* и *CHX10* способствует более эффективному генезу биполярных клеток (Yan et al., 2010), где за узкую клеточную специализированность отвечает *ASH1*.

Однако не все гены bHLH семейства, экспрессирующиеся в развивающейся сетчатке, и гомологичные пронеуральным генам дрозофилы, способны инициировать прямое репрограммирование РПЭ в нейроны сетчатки. К таким “неэффективным” генам относят *NSCL1* и *NSCL2* (Wang, Yan, 2012).

Дегенерация клеток ганглиозного слоя сетчатки является основным признаком глаукомы, поражающей людей пожилого возраста, поэтому восстановление ганглиозных клеток находится в ряду важнейших задач, как и восстановление фоторецепторов (Guimarães et al., 2018). В работе (Ma et al., 2009a) показано участие транскрипционного фактора *SOX2*, относящегося к семейству Sox, в индукции экспрессии маркеров ганглиозных и амакриновых нейронов в клетках РПЭ куриных эмбрионов *in vivo* и *in vitro* и в ингибировании экспрессии РПЭ-специфических генов. Применив подход (Ma et al., 2009a), использованный на курицах, другие исследователи (Hu et al., 2014) попытались репрограммировать клетки РПЭ, полученные из ЭСК человека (см. рис. 1). В результате они обнаружили повышенную экспрессию генов-маркеров нейрональных и глиальных клеток сетчатки и снижение экспрессии РПЭ-специфических генов. Однако в отличие от работы (Ma et al., 2009a) исследователи (Hu et al., 2014) в РПЭ человека не обнаружили экспрессию таких маркеров ганглиозных клеток, как *Islet 1/2* и протеинкиназу C, а также экспрессию *vGAT*, что указывало на отсутствие ГАМК-ергических нейронов. Кроме того, конвертированные клетки РПЭ человека не усваивали FM1-43C при стимуляции калием, что, по мнению (Hu et al., 2014), говорит об отсутствии механизма синаптической передачи. Эффект сверхэкспрессии *SOX2* в клетках РПЭ неонатального и взрослого человека *in vitro* также был оценен и в других исследованиях (Ezati et al., 2018) (см. рис. 1). Результаты показали, что *SOX2* индуцирует прямое репрограммирование клеток РПЭ человека *in vitro*, при этом наблюдается увеличение экспрессии *PAX6*, *CHX10*, *THY1* и появление родопсин-позитивных клеток, что указывает на генерацию нейрональных терминально дифференцированных клеток сетчатки (Ezati et al., 2018). *SOX2* является пионер-фактором при

прямом репрограммировании в ганглиозные клетки сетчатки для клеток РПЭ как курицы, так и человека. Но у человека происходит частичная клеточная конверсия, без образования функциональных ганглиозных клеток.

Таким образом, анализ показал, что транскрипционные факторы клеточной специализации и дифференцировки клеток сетчатки, относящиеся к семейству bHLH и SOX, индуцируют процесс прямого репрограммирования клеток РПЭ позвоночных и человека в нейроны сетчатки. При этом тип клеток, индуцируемый прямым репрограммированием, зависит от используемого гена и от его предполагаемой роли в развитии сетчатки. Так специфичными генами для получения фоторецептороподобных клеток при прямом репрограммировании клеток РПЭ являются *NEUROD1*, *NGN1* и *NGN3* (Yan et al., 2013b; Wang, Yan, 2014), для получения биполярных клеток – *ASH1* (Li et al., 2010), а для получения ганглиозных клеток – *SOX2* (Hu et al., 2014; Ezati et al., 2018). Кроме того, исследования по прямому репрограммированию различных типов клеток показали, что индуцируемый тип клеток зависит от исходного источника клеток. Так, например, *ASCL1* или *NGN2* могут конвертировать клетки астроглии мозжечка и неокортекса в нейроны головного мозга (Chouchane et al., 2017), а клетки Мюллеровской глии – в нейроны сетчатки (Pollak et al., 2013). Эти данные свидетельствуют о важной роли типовой и региональной спецификации репрограммируемой клетки в определении идентичности индуцированных нейронов (Masserdotti et al., 2016). Кроме того, очевидно, что эффективность прямого репрограммирования сильно зависит от принадлежности клеток тому или иному виду позвоночных. Так, клетки РПЭ цыплят под влиянием сверхэкспрессии генов преобразуются в морфологически, молекулярно и физиологически полноценные специфические клетки сетчатки, тогда как у человека подобное изменение происходит лишь частично. Если для прямого репрограммирования клеток РПЭ курицы достаточно одного генетического фактора, то для РПЭ человека использование единичного фактора может быть малоэффективно. Тем не менее, факторы семейства bHLH и SOX способны индуцировать прямое репрограммирование клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки, что позволяет их использовать, как пионерские факторы при прямом репрограммировании в отличие от транскрипционных факторов глазного поля.

**Роль комбинации различных транскрипционных факторов в прямом репрограммировании.** Накопленные данные свидетельствуют о том, что не один, а конкретная комбинация нескольких транскрипционных факторов, может быть наиболее эффективным инструментом для прямого репрограммирования клеток РПЭ взрослого человека. Сочетание

транскрипционных факторов глазного поля и факторов клеточной специализации из семейства bHLH, стимулирует прямое репрограммирование различных клеток глаза человека в нейроны сетчатки (Inoue et al., 2010; Seko et al., 2012). В 2012 году Секо с коллегами (Seko et al., 2012) конвертировали при помощи вирусной трансфекции генов, отвечающих за формирование и функционирование различных фоторецепторов сетчатки: *SIX3*, *PAX6*, *CRX*, *RX*, *NRL* и *NEUROD1* клетки пигментного эпителия радужки, Мюллеровской глии и цилиарного тела человека в фоторецепторы, а также фибробласты в фоторецепторы (Seko et al., 2014). Как уже было сказано выше, экзогенная экспрессия одного гена из этого ряда в одиночку не индуцирует образование фоторецепторных фенотипов в исследуемых клетках *in vitro* (Seko et al., 2012), при этом в различных комбинациях, например, *CRX*, *RX*, и *NEUROD*, которая является “эффективной”, экзогенная экспрессия генов превращает клетки радужки человека в фоторецепторы (Seko et al., 2012). Далее, при получении фоторецепторов из РСК человека *in vitro* (Inoue et al., 2010) использовали комбинированную трансфекцию генов *OTX2* и *CRX*. Повышенную эффективность прямого репрограммирования РСК по сравнению с другими клетками глаза можно объяснить, по аналогии с нейральными стволовыми клетками, не только эпигенетическими особенностями, но и их постепенной дифференцировкой, с чередованием пролиферации и промежуточных состояний дифференцировки, которая позволяет им медленно приобретать наиболее подходящий метаболизм, необходимый для приобретения и преобразования клеточной судьбы. (Masserdotti et al., 2016).

**Перспективы генетического прямого репрограммирования.** Несмотря на ярко выраженные успехи в прямом репрограммировании клеток глаза человека, оно зачастую проходит не полноценно и, хотя клетки приобретают многие характеристики нейральных клеток сетчатки они оказываются малофункциональными (Seko et al., 2012; Yan et al., 2013a; Hu et al., 2014). В отличие от эмбрионов курицы и мышей у человека клетки РПЭ несут такие разноуровневые блокировки, что даже эктопическая экспрессия специфических генов не способна полноценно их конвертировать. Дело может быть в том, что терминально дифференцированные соматические клетки богаты эпигенетическими регуляторными механизмами, которые фиксируют специфические паттерны экспрессии генов. Существуют работы, показывающие сохранение в репрограммируемых клетках эпигенетической памяти о прежнем состоянии. Так, исследователи (Hu et al., 2010) репрограммировали РПЭ плода человека до состояния ИПСК с помощью лентивирусной экспрессии *OCT4*, *SOX2*, *LIN28* и *NANOG*. Полученные линии ИПСК демонстрировали

морфологию сходную с человеческими ЭСК, они экспрессировали маркеры стволовых клеток, и образованные из них тератомы содержали производные всех трех зародышевых листков. Однако некоторые из этих линий демонстрировали явное предпочтение к редифференцировке в РПЭ. Одним из способов сохранения эпигенетической памяти в клетках является метилирование ДНК, которое способно сохраняться в течение многочисленных клеточных циклов (Kim, Costello, 2017).

В заключение по генетическому прямому репрограммированию можно с полной уверенностью сказать, что для клеток РПЭ человека использование данного метода малоэффективно, необходимо продолжить поиск других репрограммирующих факторов и условий. Кроме того, сам метод генетической трансфекции транскрипционных факторов имеет низкий процент эффективности репрограммирования (0.01–6%). Но эту эффективность можно повысить при помощи малых молекул, некодирующих РНК, факторов роста и других соединений, которые непосредственно влияют на молекулярные каскады, вовлеченных в клеточное репрограммирование, сигнальные пути, генетическую трансфекцию, на клеточный метаболизм, на пролиферацию и клеточную гибель. Показано, что защита клеток от окислительного стресса и гибели, снижение пролиферации значительно улучшает эффективность клеточного прямого репрограммирования в нейроны (Masserdotti et al., 2016). Метод последовательного увеличения экспрессии разных генов, имитирующий процессы индукции и созревание нейронов, так же увеличивает эффективность прямого репрограммирования. Кроме того, исследователи используют комбинации генетической трансфекции с эпигенетическими агентами и факторами роста. Так, в работе (Yao et al., 2018) при прямом репрограммировании клеток Мюллеровской глии исследователи сначала стимулировали сверхэкспрессию  $\beta$ -катенина с последующей сверхэкспрессией транскрипционных факторов *OTX2*, *CRX* и *NRL*. А в исследовании (Chen et al., 2010) на ИПСК мышей *in vitro* показано, что для получения клеток ганглиозного слоя требуется сверхэкспрессия *MATH5* в комбинации с факторами роста и малыми молекулами *DKK1*, *NOGGIN* и *DAPT*. Схожие результаты получены в работе (Deng et al., 2016), в которой сверхэкспрессия *ATOH7* (*MATH5*) в присутствии экзогенных молекул, участвующих в нейрогенезе сетчатки, таких как *DKK1*, *NOGGIN* и *LEFTY A*, стимулировала дифференцировку прогениторных клеток сетчатки человека, полученных из ИПСК, в клетки ганглиозного слоя сетчатки.

Из выше сказанного, можно предположить, что для полноценного прямого репрограммирования клеток РПЭ человека в клетки сетчатки необходим тщательный подбор особых условий. Необходимо использовать комбинацию эпигене-

тических (в частности, деметилирующие агенты) и генетических факторов (например, трансфекцию генов *bHLH* семейства), а также коктейли из низкомолекулярных соединений, влияющие непосредственно на ремоделирование хроматина, транскрипцию генов, сигнальные пути, клеточный цикл (пролиферацию и апоптоз) и метаболизм, и дифференцировку клеток.

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКОМУ МЕТОДЫ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

**Химическое прямое репрограммирование** представляет собой прямое репрограммирование клеток при помощи малых молекул, основанное на управлении путями, которые определяют клеточную судьбу. Показано, что ингибирование малыми молекулами четырех сигнальных путей, *Notch*, *TGF- $\beta$* , *BMP*, и *GSK-3 $\beta$* , оказалось достаточным для активации нейрогенеза в гиппокампе головного мозга мыши *in vivo* (Yin et al., 2019). Типичный низкомолекулярный коктейль, используемый для конверсии клеток включает в себя следующие компоненты: эпигенетические модуляторы; молекулы, подавляющие исходные характеристики клеток; соединения, индуцирующие характеристики получаемых клеток; факторы, способствующие выживаемости и функционированию репрограммируемых клеток *in vitro* (Xie et al., 2017). Так, в работе (Zhu et al., 2010) комбинация химических соединений и одного фактора транскрипции оказалось достаточным для репрограммирования соматической клетки в ИПСК. Исследователи (Liu et al., 2013) при помощи комбинации *NGN2* с малыми молекулами, форсколином, активатором цАМФ в сигнальном пути РКА, и дорсоморфином, ингибитором *BMP*, напрямую репрограммировали фибробласты легкого плода человека в холинергические нейроны с функциональной электрофизиологией. Позднее исследователи (Hou et al., 2013) показали, что комбинации только из семи малых молекул достаточно для химического репрограммирования соматических клеток в ИПСК. За последние несколько лет подходы с использованием низкомолекулярных молекул достигли значительных успехов в индукции плюрипотентных или функционально дифференцированных клеток из соматических клеток (Xie et al., 2017). По сравнению с другими методами, низкомолекулярные соединения имеют ряд уникальных преимуществ, таких как универсальность структуры и простота в манипулировании в зависимости от времени и концентрации. Наряду с этим, не стоит забывать о проблемах токсичности, способах доставки малых молекул и о том, что сам процесс подбора необходимых малых молекул может быть трудоемким и дорогостоящим. Тем не менее, сегодня многие исследо-

ватели считают, что развитие технологий с использованием малых молекул и CRISPR/CAS9 системы может лечь в основу успешной регенеративной терапии для восстановления тканей.

**МикроРНК прямое репрограммирование.** Известно, что микроРНК играют важную роль в пост-транскрипционной регуляции, нейральной дифференцировке, морфологическом и фенотипическом развитии (Ebert, Sharp, 2012). МикроРНК регулируют не только экспрессию генов и белков, но и действуют как эпигенетические факторы. Многие исследования показали, что микроРНК обладают свойством прямого воздействия на субъединицы комплексов ремоделирования хроматина, ассоциированных с АТФ-зависимым BRG/BRM-фактором (BAF), который является критическим при дифференцировке нейронов (Staahl et al., 2013; Abernathy et al., 2017; Lu, Yoo, 2018). При прямом репрограммировании соматических клеток в нейроны используют микроРНК в комбинациях с различными транскрипционными факторами (Yoo et al., 2011). Исследователи (Yoo et al., 2011) использовали miR-9/9\* и miR-124, микроРНК специфичные для нервных клеток, в комбинации с транскрипционным фактором *NEUROD1* для превращения фибробластов человека в нейроны. Однако полученные клетки не всегда демонстрировали повторяющийся потенциал действия, что указывает на незрелость нейронов. Для решения этой проблемы та же группа исследователей использовала два других фактора, *ASCL1* и *MYT1L*, где были получены клетки с более высокой степенью зрелости (Yoo et al., 2011). Многочисленные исследования демонстрируют, что именно комбинация микроРНК и узкоспециализированных транскрипционных факторов является наиболее эффективной для получения нейронов из других соматических клеток.

Хотя, в доступной нам литературе мы не встретили сообщений по использованию комбинации эпигенетических, генетических и низкомолекулярных соединений для прямого репрограммирования клеток РПЭ человека, достигнутые успехи по прямому репрограммированию иных соматических клеток в различные подтипы нейронов, вселяют надежду на возможность этого процесса.

## ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Последние достижения в области вычислительной биологии – это создание специфических программ для прогнозирования транскрипционных факторов, необходимых для клеточного прямого репрограммирования. Вычислительные алгоритмы CellNet, Mogrify, BART, MAGICACT и CellRouter анализируют, классифицируют и предсказывают функции транскрипционных факторов, тем са-

мым облегчая и ускоряя процесс скрининга (Morris et al., 2014; El Wazan et al., 2019). Другой подход заключается в создании компьютерной модели клетки, которая позволяет создавать симуляцию событий при использовании тех или иных факторов прямого репрограммирования, например DeepNEU (Danter, 2019). Хотя эти переломные алгоритмические модели все еще находятся в зачаточном состоянии, дальнейшее их развитие улучшит наше понимание фундаментальных свойств клеток и молекулярного взаимодействия факторов транскрипции, необходимых для прямого репрограммирования (El Wazan et al., 2019).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие исследования показывают высокий потенциал клеток РПЭ позвоночных к прямому репрограммированию в нейроны сетчатки *in vivo*. Несмотря на незначительное число работ по прямому репрограммированию клеток РПЭ человека, можно с полной уверенностью сказать, что клетки РПЭ человека способны отвечать на воздействия генной инженерии. РПЭ доступен для различных векторов, доставляющих в клетки разнообразные молекулы: гены транскрипционных факторов, химерные эндонуклеазы, систему CRISPR/Cas, рекомбинантные белки и низкомолекулярные соединения. Клетки отвечают на присутствие экзогенного генома ожидаемо для исследователей. Основываясь на результатах полученных по прямому репрограммированию клеток позвоночных в клетки сетчатки, на достижениях вычислительной биологии, можно предположить наиболее оптимальный набор факторов из эпигенетических, генетических и химических факторов с добавлением нейротропных факторов и факторов роста для успешной конверсии клеток РПЭ человека в нейроны сетчатки.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарность коллегам и рецензентам в помощи подготовки статьи.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50135. Работа выполнена в рамках раздела Госзадания ИБР РАН № 0108-2019-0004.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.



### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор Л.А. Ржанова проводила анализ мировой литературы и написание основного текста статьи. Авторы А.В. Кузнецова участвовала в редактировании и обсуждении текста статьи, М.А. Александрова инициировала написание обзора, проводила сбор литературы и редактирование текста статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abernathy D.G., Kim W.K., McCoy M.J. et al.* MicroRNAs induce a permissive chromatin environment that enables neuronal subtype-specific reprogramming of adult human fibroblasts // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 21. № 3. P. 332–348.e9.
- Al-Hussaini H., Kam J.H., Vugler A. et al.* Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 1784–1791.
- Al-Saikhan F.I.* The gene therapy revolution in ophthalmology // *Saudi J. Ophthalmol. Off. J. Saudi Ophthalmol. Soc.* 2013. V. 27. № 2. P. 107–111.
- Anderson D.H., Stern W.H., Fisher S.K. et al.* The onset of pigment epithelial proliferation after retinal detachment // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1981. V. 21. № 1. Pt 1. P. 10–16.
- Artero-Castro A., Popelka S., Jendelova P. et al.* The identification of small molecules that stimulate retinal pigment epithelial cells: potential novel therapeutic options for treating retinopathies // *Expert Opin. Drug Discov.* 2019. V. 14. № 2. P. 169–177.
- Azuma N., Tadokoro K., Asaka A. et al.* Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 8. P. 1059–1068.
- Bainbridge J.W.B., Smith A.J., Barker S.S. et al.* Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 21. P. 2231–2239.
- Bassett E.A., Williams T., Zacharias A.L. et al.* AP-2alpha knockout mice exhibit optic cup patterning defects and failure of optic stalk morphogenesis. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. № 9. P. 1791–1804.
- Bäumer N., Marquardt T., Stoykova A. et al.* Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6 // *Development*. 2003. V. 130. № 13. P. 2903–2915.
- Bernier G., Panitz F., Zhou X. et al.* Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos // *Mech. Dev.* 2000. V. 93. № 1–2. P. 59–69.
- Bharti K., Gasper M., Ou J. et al.* A regulatory loop involving PAX6, MITF, and WNT signaling controls retinal pigment epithelium development // *PLoS Genet.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002757>
- Brzezinski J.A., Kim E.J., Johnson J.E. et al.* Ascl1 expression defines a subpopulation of lineage-restricted progenitors in the mammalian retina // *Development*. 2011. V. 138. № 16. P. 3519–3531.
- Bumsted K.M., Barnstable C.J.* Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the microphthalmia (mi/mi) mouse // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. V. 41. № 3. P. 903–908.
- Burnight E.R., Gupta M., Wiley L.A. et al.* Using CRISPR-Cas9 to generate gene-corrected autologous iPSCs for the treatment of inherited retinal degeneration // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 9. P. 1999–2013.
- Chan L., Mahajan V.B., Tsang S.H.* Genome surgery and gene therapy in retinal disorders // *Yale J. Biol. Med.* 2017. V. 90. № 4. P. 523–532.
- Chen M., Chen Q., Sun X. et al.* Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts // *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 2010. V. 51. № 11. P. 5970.
- Chiba C., Mitashov V.* Cellular and molecular events in the adult newt retinal regeneration // Ed. Chiba C. *Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: From Fish to Human*. Research Signpost, Trivandrum, India. 2007. P. 15–33.
- Chichagova V., Hallam D., Collin J. et al.* Cellular regeneration strategies for macular degeneration: Past, present and future // *Eye*. 2018. 32(5). 946–971.
- Chouchane M., Melo de Farias A.R., Moura D.M. de S. et al.* Lineage reprogramming of astroglial cells from different origins into distinct neuronal subtypes // *Stem cell reports*. 2017. V. 9. № 1. P. 162–176.
- Danter W.R.* DeepNEU: cellular reprogramming comes of age – a machine learning platform with application to rare diseases research // *Orphanet J. Rare Dis.* 2019. V. 14. № 1. P. 13.
- Deng F., Chen M., Liu Y. et al.* Stage-specific differentiation of iPSCs toward retinal ganglion cell lineage // *Mol. Vis.* 2016. V. 22. P. 536.
- Dunn K.C., Aotaki-Keen A.E., Putkey F.R. et al.* ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties // *Exp. Eye Res.* 1996. V. 62. № 2. P. 155–170.
- Dvorianchikova G., Seemungal R.J., Ivanov D.* The epigenetic basis for the impaired ability of adult murine retinal pigment epithelium cells to regenerate retinal tissue // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 3860.
- Ebert M.S., Sharp P.A.* Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes // *Cell*. 2012. V. 149. № 3. P. 515.
- El Wazan L., Urrutia-Cabrera D., Wong R.C.-B.* Using transcription factors for direct reprogramming of neurons in vitro // *World J. Stem Cells*. 2019. V. 11. № 7. P. 431–444.
- Engelhardt M., Bogdahn U., Aigner L.* Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin // *Brain Res.* 2005. V. 1040. № 1–2. P. 98–111.
- Ezati R., Etemadzadeh A., Soheili Z.-S. et al.* The influence of rAAV2-mediated SOX2 delivery into neonatal and adult human RPE cells; a comparative study // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. № 2. P. 1222–1235.

- Fisher C.R., Ferrington D.A. Perspective on AMD pathobiology: a bioenergetic crisis in the RPE // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018. V. 59. № 4. P. AMD41–AMD47.
- Frayer W.C. Reactivity of the retinal pigment epithelium: an experimental and histopathologic study // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1966. V. 64. P. 586.
- Fu X., Huu V.A.N., Duan Y. et al. Clinical applications of retinal gene therapies // *Precis. Clin. Med.* 2018. V. 1. № 1. P. 5–20.
- Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle // *Curr. Top Dev. Biol.* 2010. V. 93. P. 61–84.
- Fuhrmann S., Zou C., Levine E.M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis // *Exp. Eye Res.* 2014. V. 123. P. 141–150.
- Fujimura N., Taketo M.M., Mori M. et al. Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium // *Dev. Biol.* 2009. V. 334. № 1. P. 31–45.
- Grigoryan E.N., Markitantova Y.V., Avdonin P.P. et al. Study of regeneration in amphibians in age of molecular-genetic approaches and methods // *Russ. J. Genet.* 2013. V. 49. № 1. P. 46–62.
- Guimarães R.P. de M., Landeira B.S., Coelho D.M. et al. Evidence of Müller glia conversion into retina ganglion cells using Neurogenin2 // *Front. Cell. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 410.
- Hou P., Li Y., Zhang X. et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds // *Science (80-)*. 2013. V. 341. № 6146. P. 651–654.
- Hu Q., Chen R., Teesalu T. et al. Reprogramming human retinal pigmented epithelial cells to neurons using recombinant proteins // *Stem Cells Transl. Med.* 2014. V. 3. № 12. P. 1526–1534.
- Hu Q., Friedrich A.M., Johnson L.V. et al. Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation // *Stem Cells.* 2010. V. 28. № 11. P. 1981–1991.
- Inoue T., Coles B.L.K., Dorval K. et al. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells // *Stem Cells.* 2010. V. 28. № 3. P. 489–500.
- Islam M.R., Nakamura K., Casco-Robles M.M. et al. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 6043.
- Iwafuchi-Doi M., Zaret K.S. Pioneer transcription factors in cell reprogramming // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 24. P. 2679–2692.
- Jasoni C.L., Walker M.B., Morris M.D. et al. A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system // *Development.* 1994. V. 120. № 4. P. 769–783.
- Jiang D.J., Xu C.L., Tsang S.H. Revolution in gene medicine therapy and genome surgery // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 12.
- Karali M., Banfi S. Inherited retinal dystrophies: The role of gene expression regulators // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015. V. 61. P. 115–119.
- Kashani A.H., Lebkowski J.S., Rahhal F.M. et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 435. P. eaao4097.
- Kharitonov A.E., Surdina A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Possibilities for using pluripotent stem cells for restoring damaged eye retinal pigment epithelium // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 3. P. 30–39.
- Kim M., Costello J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory // *Exp. Mol. Med.* 2017. 49(4).
- Kole C., Klipfel L., Yang Y. et al. Otx2-genetically modified retinal pigment epithelial cells rescue photoreceptors after transplantation // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 1. P. 219–237.
- Kuzmich A.I., Tyulkina D.V., Vinogradova T.V. et al. Pioneer transcription factors in normal development and carcinogenesis // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2015. V. 41. № 6. P. 570–577.
- Kuznetsova A.V. Morphological and physiological characteristics of the native retinal pigment epithelium in vertebrate animals and human // *Biol. Bull. Rev.* 2014. <https://doi.org/10.1134/s2079086414020030>
- Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Heterogeneity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in different culturing systems // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 4. P. 569–577.
- Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A. Human adult retinal pigment epithelial cells as potential cell source for retina recovery // *Cell Tissue Biol.* 2011. V. 5. № 5. P. 495–502.
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium // *J. Ophthalmol.* 2014. V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/801787>
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Chentsova E.V. et al. Effect of hrWnt7a on human retinal pigment epithelial cells in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 534–540.
- Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Rzhanova L.A. et al. Mechanisms of dedifferentiation of adult human retinal pigment epithelial cells in vitro. Morphological and molecular genetic analysis // *Cell Tissue Biol.* 2019a. V. 13. № 2. P. 107–119.
- Kuznetsova A.V., Rzhanova L.A., Kurinov A.M. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on signaling pathways in adult human retinal pigment epithelial cells // *Cell Tissue Biol.* 2019b. V. 13. № 4. P. 292–304.
- La Cour M. ACTA-EVER lecture 2007. The retinal pigment epithelium: friend or foe? // *Acta Ophthalmol.* 2008. V. 86. № 6. P. 593–597.
- Lagutin O., Zhu C.C., Furuta Y. et al. Six3 promotes the formation of ectopic optic vesicle-like structures in mouse embryos // *Dev. Dyn.* 2001. V. 221. № 3. P. 342–349.
- Lanning J.L., Wallace J.S., Zhang D. et al. Altered melanocyte differentiation and retinal pigmented epithelium transdifferentiation induced by Mash1 expression in

- pigment cell precursors // *J. Invest. Dermatol.* 2005. V. 125. № 4. P. 805–817.
- Léveillard T., Klipfel L.* Mechanisms underlying the visual benefit of cell transplantation for the treatment of retinal degenerations // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 3.
- Li X., Ma W., Zhuo Y. et al.* Using neurogenin to reprogram chick RPE to produce photoreceptor-like neurons // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. № 1. P. 516–525.
- Liang L., Yan R.-T., Li X. et al.* Reprogramming progeny cells of embryonic RPE to produce photoreceptors: development of advanced photoreceptor traits under the induction of neuroD // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. V. 49. № 9. P. 4145–4153.
- Liang L., Yan R.-T., Ma W. et al.* Exploring RPE as a source of photoreceptors: Differentiation and integration of transdifferentiating cells grafted into embryonic chick eyes // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006. V. 47. № 11. P. 5066–5074.
- Liu M.-L., Zang T., Zou Y. et al.* Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2183.
- Loosli F., Winkler S., Wittbrodt J.* Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina // *Genes Dev.* 1999. V. 13(6). № 6. P. 649–654.
- Lu Y.-L., Yoo A.S.* Mechanistic insights into microRNA-induced neuronal reprogramming of human adult fibroblasts // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 522.
- Luo M., Chen Y.* Application of stem cell-derived retinal pigmented epithelium in retinal degenerative diseases: Present and future // *Int. J. Ophthalmol.* 2018. V. 11. № 1. P. 150–159.
- Luz-Madriral A., Grajales-Esquivel E., McCorkle A. et al.* Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury // *BMC Biol.* 2014. V. 12. № 28.
- Ma W., Yan R.-T., Li X. et al.* Reprogramming retinal pigment epithelium to differentiate toward retinal neurons with Sox2 // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 6. P. 1376–1387.
- Mao W., Yan R.-T., Wang S.-Z.* Reprogramming chick RPE progeny cells to differentiate towards retinal neurons by ash1 // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 2309–2320.
- Mao W., Yan R.-T., Wang S.Z.* Proneural gene ash1 promotes amacrine cell production in the chick retina // *Dev. Neurobiol.* 2009. V. 69. № 2–3. P. 88–104.
- Martínez-Morales J.R., Dolez V., Rodrigo I. et al.* OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 24. P. 21721–21731.
- Martínez-Morales J.R., Rodrigo I., Bovolenta P.* Eye development: A view from the retina pigmented epithelium // *Bio Essays.* 2014. V. 26. № 7. P. 766–777.
- Masserdotti G., Gascón S., Götz M.* Direct neuronal reprogramming: Learning from and for development // *Dev.* 2016. V. 143(14). P. 2494–2510.
- Mathers P.H., Grinberg A., Mahon K.A. et al.* The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development // *Nature.* 1997. V. 387. № 6633. P. 603–607.
- Matsunaga H., Handa J.T., Aotaki-Keen A. et al.* Beta-galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999. V. 40. № 1. P. 197–202.
- Mayran A., Sochodolsky K., Khetchoumian K. et al.* Pioneer and nonpioneer factor cooperation drives lineage specific chromatin opening // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3807.
- Milyushina L.A., Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N. et al.* Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. V. 151. № 4.
- Milyushina L.A., Poltavtseva R.A., Marei M.V. et al.* In vitro phenotypic modification of pigmented epithelium cells from human eye at early stages of development // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. V. 148. № 1.
- Milyushina L.A., Verdiev B.I., Kuznetsova A.V. et al.* Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 153. № 1.
- Morris S.A., Cahan P., Li H. et al.* Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via CellNet // *Cell.* 2014. V. 158. № 4. P. 889–902.
- Nguyen M., Arnheiter H.* Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF // *Development.* 2000. V. 127. № 16.
- Nguyen T., Wong R.C.-B.* Neuroregeneration using in vivo cellular reprogramming // *Neural. Regen. Res.* 2017. V. 12. № 7. P. 1073–1074.
- Öner A.* Recent Advancements in gene therapy for hereditary retinal dystrophies // *Turkish J. Ophthalmol.* 2017. V. 47. № 6. P. 338.
- Öner A.* Stem Cell Treatment in retinal diseases: Recent developments // *Turkish J. Ophthalmol.* 2018. V. 48. № 1. P. 33–38.
- Otteson D.C.* Talkin' about my (re)generation: The who of intrinsic retinal stem cells // *Neuroscience.* 2017. V. 346. P. 447–449.
- Pasque V., Jullien J., Miyamoto K. et al.* Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming // *Trends Genet.* 2011. V. 27(12). P. 516–525.
- Pollak J., Wilken M.S., Ueki Y. et al.* ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors // *Development.* 2013. V. 140. № 12. P. 2619–2631.
- Rabenlehner D., Stanzel B. V., Krebs I. et al.* Reduction of iatrogenic RPE lesions in AMD patients: evidence for wound healing? // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008. V. 246. № 3. P. 345–352.
- Rambhatla L., Chiu C.P., Glickman R.D. et al.* In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. № 5. P. 1622–1630.
- Reese B.E., Keeley P.W.* Genomic control of neuronal demographics in the retina // *Prog. Retin. Eye Res.* 2016. V. 55. P. 246–259.
- Remez L.A., Onishi A., Menuchin-Lasowski Y. et al.* Pax6 is essential for the generation of late-born retinal neurons and for inhibition of photoreceptor-fate during late stages of retinogenesis // *Dev. Biol.* 2017. V. 432. № 1. P. 140–150.

- Sakami S., Etter P., Reh T.A.* Activin signaling limits the competence for retinal regeneration from the pigmented epithelium // *Mech. Dev.* 2008. V. 125. № 1–2. P. 106–116.
- Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B. et al.* Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // *Cell. Stem. Cell.* 2012. V. 6; 10(1). P. 88–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.11.018>
- Satarian L., Nourinia R., Safi S. et al.* Intravitreal injection of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with advanced retinitis pigmentosa; a safety study // *J. Ophthalmic Vis. Res.* 2017. V. 12. № 1. P. 58–64.
- Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G. et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report // *Lancet.* 2012. V. 379. № 9817. P. 713–720.
- Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies // *Lancet.* 2015. V. 385. № 9967. P. 509–516.
- Seko Y., Azuma N., Ishii T., et al.* Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of CRX, RAX, OTX2 and NEUROD // *Genes Cells.* 2014. V. 19. № 3. P. 198–208.
- Seko Y., Azuma N., Kaneda M. et al.* Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of CRX, RX and NEUROD // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. e35611.
- Stahl B.T., Tang J., Wu W., et al.* Kinetic analysis of npBAF to nBAF switching reveals exchange of SS18 with CREST and integration with neural developmental pathways // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 25. P. 10348–10361.
- Tamiya S., Kaplan H.J.* Role of epithelial – mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy // *Exp. Eye Res.* 2016. V. 142. № 110. P. 26–31.
- Tomita K., Nakanishi S., Guillemot F. et al.* Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina // *Genes to Cells.* 1996. V. 1. № 8. P. 765–774.
- Toy J., Yang J.M., Leppert G.S. et al.* The Optx2 homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 18. P. 10643–10648.
- Tso M.O., Fine B.S.* Repair and late degeneration of the primate foveola after injury by argon laser // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1979. V. 18. № 5. P. 447–461.
- Ueki Y., Wilken M.S., Cox K.E. et al.* Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 44. P. 13717–13722.
- Vergara M.N., Del Rio-Tsonis K.* Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system // *Mol. Vis.* 2009. V. 15. P. 1000–1013.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature.* 2010. V. 463. № 7284. P. 1035–1041.
- Wang S.-Z., Ma W., Yan R.-T. et al.* Generating retinal neurons by reprogramming retinal pigment epithelial cells // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010. V. 10. № 8. P. 1227–1239.
- Wang S.-Z., Yan R.-T.* The retinal pigment epithelium: a convenient source of new photoreceptor cells? // *J. Ophthalmic Vis. Res.* 2014. V. 9. № 1. P. 83–93.
- Wang S.-Z., Yan R.-T.* Chick retinal pigment epithelium transdifferentiation assay for proneural activities // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 884. P. 201–209.
- Xie X., Fu Y., Liu J.* Chemical reprogramming and transdifferentiation // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017. V. 46. P. 104–113.
- Yan R.-T., He L., Wang S.Z.* Pro-photoreceptor activity of chick neurogenin1 // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009. V. 50(12). № 12. P. 5567–5576.
- Yan R.-T., He L., Zhan W. et al.* Induction of ectopic retina-like tissue by transgenic expression of neurogenin // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 1. P. e0116171.
- Yan R.-T., Li X., Huang J. et al.* Photoreceptor-like cells from reprogramming cultured mammalian RPE cells // *Mol. Vis.* 2013a. V. 19. P. 1178–1187.
- Yan R.-T., Li X., Wang S.-Z.* Photoreceptor-like cells in transgenic mouse eye // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013b. V. 54. № 7. P. 4766–4775.
- Yan R.-T., Liang L., Ma W. et al.* Neurogenin1 effectively reprograms cultured chick retinal pigment epithelial cells to differentiate toward photoreceptors // *J. Comp. Neurol.* 2010. V. 518. № 4. P. 526–546.
- Yan R.-T., Ma W.X., Wang S.Z.* Neurogenin2 elicits the genesis of retinal neurons from cultures of nonneural cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 26. P. 15014–15019.
- Yan R.-T., Wang S.-Z.* NeuroD induces photoreceptor cell overproduction in vivo and de novo generation in vitro // *J. Neurobiol.* 1998. V. 36. № 4. P. 485–496.
- Yao K., Qiu S., Wang Y.V., et al.* Restoration of vision after de novo genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas. // *Nature.* 2018. V. 560. № 7719. P. 484–488.
- Yin J.-C., Zhang L., Ma N.-X. et al.* Chemical conversion of human fetal astrocytes into neurons through modulation of multiple signaling pathways // *Stem cell reports.* 2019. V. 12. № 3. P. 488–501.
- Yoo A.S., Sun A.X., Li L. et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons // *Nature.* 2011. V. 476. № 7359. P. 228–231.
- Zaghloul N.A., Yan B., Moody S.A.* Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis // *Biol. Cell.* 2005. V. 97. № 5. P. 321–337.
- Zagozewski J.L., Zhang Q., Pinto V.I. et al.* The role of homeobox genes in retinal development and disease // *Dev. Biol.* 2014. V. 393. № 2. P. 195–208.
- Zhang N.L., Samadani E.E., Frank R.N.* Mitogenesis and retinal pigment epithelial cell antigen expression in the rat after krypton laser photocoagulation // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993. V. 34. № 8. P. 2412–2424.
- Zhao S., Thornquist S.C., Barnstable C.J.* In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina // *Brain Res.* 1995. V. 677. № 2. P. 300–310.
- Zhu S., Li W., Zhou H. et al.* Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 7. № 6. P. 651–655.

## Reprogramming of Differentiated Mammalian and Human Retinal Pigment Epithelium: Current Achievements and Prospects

L. A. Rzhanova<sup>1,\*</sup>, A. V. Kuznetsova<sup>1</sup>, and M. A. Aleksandrova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

<sup>2</sup>*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*\*e-mail: 9303923@gmail.com*

Impairment of the homeostatic and functional integrity of the retina and retinal pigment epithelium (RPE) is the main reason of a number of degenerative diseases of the human eye, accompanied by loss of vision. Despite the significant progress made over the past decades in the development of new methods of treatment for this pathology, a number of complications remain when using surgical methods of vision correction and so far insurmountable limitations in the use of modern approaches, such as gene therapy and genetic engineering. One of the promising approaches to the treatment of degenerative diseases of the retina may be an approach based on the use of regenerative abilities of own endogenous cells with high plasticity, in particular RPE cells and Muller glia. Currently, vertebrate RPE cells are of great interest as a source of new photoreceptors and other neurons in the degraded retina *in vivo*. In this regard, the possibilities of their direct reprogramming by genetic, epigenetic, chemical methods and their combination are investigated. The review focuses on research on gene reprogramming of vertebrate RPE cells into retinal neurons, with detailed analysis of the genes used as the main reprogramming factors, comparative analysis and extrapolation of experimental data from animals to humans. In addition, the review covers work on the use of alternative genetically-directed reprogramming approaches-chemically-mediated with the use of cocktails of therapeutic low-molecular compounds and microRNAs. In general, the results of research indicate the complexity of the process of reprogramming human RPE cells into retinal neurons. However, taking into account the results of reprogramming vertebrate cells, the availability of human RPE cells for various vectors that deliver a variety of molecules to cells: transcription factors, chimeric endonucleases, recombinant proteins and low-molecular compounds, we can assume the most optimal set of factors for the successful conversion of human RPE cells into retinal neurons.

*Keywords:* retinal pigment epithelium, RPE, retinal regeneration, gene-directed reprogramming, transcription factors, degenerative-dystrophic diseases of the eye