

ИНГИБИРОВАНИЕ miR-21 СПОСОБСТВУЕТ ПРОЦЕССУ СТАРЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК NT2 АСТРОЦИТОВ

© 2021 V. Balint¹, D. Stanisavljevic-Ninkovic¹, N. Anastasov², S. Lazic¹, N. Kovacevic-Grujicic¹, M. Stevanovic^{1,3,4}, A. Lazic^{1*}

¹ Laboratory for Human Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, 11042 Belgrade, Serbia; e-mail: andrijanak@imgge.bg.ac.rs

² Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Institute of Biological and Medical Imaging, 85764 Neuherberg, Germany

³ Faculty of Biology, University of Belgrade, 11158 Belgrade, Serbia

⁴ Serbian Academy of Sciences and Arts, 11000 Belgrade, Serbia

Поступила в редакцию 06.08.2021

После доработки 28.09.2021

Принята к публикации 28.09.2021

Астроциты являются основными клетками, поддерживающими гомеостаз центральной нервной системы (ЦНС). Они обеспечивают нейронам механическую, метаболическую и трофическую поддержку, поэтому нарушение функционирования или приобретение этими клетками фенотипа, ассоциированного с клеточным старением, могут вносить вклад в нарушение функционирования всей ЦНС и возникновение патологий. Тем не менее молекулярные механизмы, лежащие в основе сложной физиологии астроцитов, изучены недостаточно. Недавно было показано, что микроРНК участвуют в регуляции функционирования астроцитов через различные механизмы. Так, miR-21 является специфичной для астроцитов микроРНК, играющей важную роль в развитии астроглиоза. В то же время связи между этой микроРНК и старением астроцитов показано не было. С целью исследования роли miR-21 в этих клетках с прицельным вниманием на процессы клеточного старения мы использовали астроциты, полученные из клеток NT2 (NT2/A). С помощью технологии антисмысловых РНК мы понизили уровень экспрессии miR-21 как в незрелых, так и в зрелых клетках NT2/A. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что снижение уровня экспрессии miR-21 приводит к остановке клеточного роста и преждевременному старению клеток, что подтверждается такими маркерами клеточного старения, как повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла (p21 и p53) и повышенная активность β-галактозидазы, ассоциированной со старением клеток. Кроме того, проведенный нами анализ *in silico* показал, что многие из генов, для которых ранее была показана повышенная экспрессия при индуцированном старении астроцитов, предположительно являются мишенями miR-21. В целом, полученные нами результаты указывают на то, что miR-21 может функционировать как регулятор старения астроцитов. По нашим сведениям, это первые данные, демонстрирующие связь между miR-21 и старением астроцитов. С учетом того, что сенесцентные астроциты ассоциированы с развитием различных патологий ЦНС, разработка новых терапевтических стратегий, основанных на применении микроРНК, может предотвратить наступление клеточного старения и способствовать улучшению физиологического состояния.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: miR-21, астроциты, NT2/D1, клеточное старение.

DOI: 10.31857/S0320972521110075

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК – это небольшие некодирующие РНК, опосредующие негативную регуляцию экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. В последние годы была признана важная роль микроРНК в механизмах регуляции,

лежащих в основе дифференцировки нейронов [1]. МикроРНК также участвуют в контроле широкого спектра функций в головном мозге взрослого организма как в физиологических, так и в патологических условиях [2].

МикроРНК-21 (miR-21) является одним из самых интригующих представителей микроРНК в связи с широким набором её функций. В частности, miR-21 работает как онкоген: показано, что при различных опухолях, включая глиобластому, происходит повышение её экспрессии [3, 4]. Помимо этого, указанная микроРНК участвует в регуляции процессов развития. Так, показано, что miR-21 способствует пролифера-

Принятые сокращения: anti-miR-21 – антисмысловая miR-21; miR-21 – микроРНК-21; NT2/A – астроциты, полученные из клеток NT2/D1; RA – ретиноевая кислота; SA-β-gal – ассоциированная со старением бета-галактозидаза; SCI – повреждение спинного мозга.

* Адресат для корреспонденции.

ции нейрональных стволовых клеток и дифференцировке нейронов [5]. Кроме того, она вносит вклад в поддержание гомеостаза тканей взрослого организма, т.к. повышение уровня её экспрессии было выявлено в реактивных астроцитах при повреждении спинного мозга (SCI, spinal cord injury), где выраженные положительные изменения астроцитов были опосредованы действием miR-21 [6, 7]. Показано, что эта микроРНК также участвует в регуляции иммунной системы, обладая способностью модулировать «включение/выключение» воспалительного ответа в соответствующее время путем стимулирования или ингибирования сигнальных путей, в которых задействованы ядерный фактор каппа В (NF- κ B) и NOD-подобный рецепторный белок 3 (NLRP3), которые лежат в основе хронических системных воспалительных процессов, протекающих на низком уровне, которые имеют место при старении организма человека [8].

Астроциты являются основными клетками, поддерживающими гомеостаз ЦНС [9]. Они тесно интегрированы в нейронные сети и принимают участие в различных аспектах физиологии [9] и патологии [10] ЦНС. Эти клетки обладают уникальной способностью в ответ на повреждение трансформироваться из «дремлющего» (спокойного) в реактивное состояние. Этот феномен известен как реактивный астроглиоз, служащий в качестве компенсаторного ответа, модулирующего повреждение тканей и их восстановление [11]. Утрата астроцитами их функций (или усиление их нейровоспалительной функции) в результате клеточного старения может иметь серьезные последствия в виде развития возрастных нейродегенеративных заболеваний [12]. Противоположный реактивному астроглиозу процесс биологического старения клеток завершается состоянием, которое характеризуется необратимой остановкой роста, сопряженной с появлением других маркеров клеточного старения, таких как повышенная активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы (SA- β -gal) и усиленная экспрессия ингибиторов клеточного цикла, а именно p21, p16 и p53 [12]. Тем не менее молекулярные механизмы, лежащие в основе всех этих процессов, изучены недостаточно хорошо. Несмотря на то что miR-21 рассматривается как потенциальная молекулярная мишень для оказания воздействия на процесс астроглиоза и улучшения клинического исхода после SCI [7], данных о связи между этой микроРНК и старением астроцитов пока не опубликовано.

Для исследования роли miR-21 в астроцитах с упором на процесс клеточного старения мы использовали в качестве модельной системы ли-

нию плюрипотентных клеток NT2/D1 эмбриональной карциномы человека. Эти клетки обладают способностью подвергаться дифференцировке по нейрональной линии с образованием популяций нейронов и глии под действием ретиноевой кислоты (RA) [13, 14]. Астроциты, полученные из клеток NT2 (NT2/A), похожи на первичные астроциты по таким показателям, как присутствие белков промежуточных филаментов, остановка роста и быстрый ответ на повреждения [14]. Кроме того, в смешанных культурах клетки NT2/A обладают активной системой транспорта глутамата и поддерживают рост и выживание нейронов, также образующихся из клеток NT2 (NT2/N) [14]. Мы инициировали снижение уровня экспрессии miR-21 как в незрелых, так и в зрелых клетках NT2/A и проанализировали влияние этих изменений на выживаемость, пролиферацию клеток и индукцию процессов клеточного старения. Согласно полученным нами результатам, снижение уровня экспрессии miR-21 индуцирует остановку роста и преждевременное старение незрелых и зрелых клеток NT2/A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток и их дифференцировка. Плюрипотентные клетки карциномы эмбриона человека линии NT2/D1 (ATCC® CRL-1973™) были культивированы как описано ранее [15]. Индукция дифференцировки клеток NT2/D1 достигалась добавлением в культуральную среду 10 мкМ полностью транс-ретиноевой кислоты («Sigma-Aldrich», США) на протяжении 4 недель. Обогащенную нейронами популяцию клеток получали в результате механического отделения, как было описано ранее [13]. Астроциты, продуцированные из клеток NT2, были получены из остающихся прикрепленными клеток согласно опубликованному протоколу [14]. Вкратце, после удаления NT2/N оставшиеся клетки были обработаны трипсином и помещены в новую культуральную посуду. Клетки культивировали в течение дополнительных 4 недель в среде DMEM с 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) с высоким содержанием глюкозы, проводя субкультивирование при достижении конfluence (на 7–14 сут.). Морфологию клеток изучали с помощью фазово-контрастного микроскопа DM IL LED Inverted Microscope («Leica Microsystems», Германия).

Лентивирусная трансдукция астроцитов, полученных из клеток NT2/D1. Лентивирусные частицы получали путем транзientной котрансфекции клеток HEK-293T (ATCC® CRL-1573™) с

использованием реагента для трансфекции PEI MAX™ («Polysciences Inc.», США) согласно инструкции производителя. Котрансфекцию клеток HEK-293T проводили в культуральной посуде (диаметром 10 см) с 1,7 мкг pCMV-VSV-G (оболочечная плаزمид, envelope plasmid), 1 мкг pRSV-REV и 2,5 мкг pMDLg/RRE (упаковочные плазмиды, packaging plasmids) и 10 мкг лентивирусной антисмысловой конструкции для трансдукции miR-21 (anti-miR-21) [16] или пустого вектора pGreenPuro (pGP; «System Biosciences», США). Астроциты, полученные из клеток NT2/D1, инкубировали в течение ночи в среде, содержащей лентивирусные частицы (собранные через 48 ч после трансфекции) и 8 мкг/мл полибрейна («Sigma-Aldrich»). Отбор с помощью пурамицина инициировали через 48 ч после трансдукции. Клетки культивировали в течение 3 сут. в среде, содержащей сыворотку с 0,3 мкг/мл пурамицина (селективная среда). Не подвергшиеся трансдукции клетки, культивируемые в селективной среде, были использованы для контроля эффективности действия пурамицина. Клетки, устойчивые к действию пурамицина, были использованы для дальнейших экспериментов. GFP-позитивность клеток была подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии.

Иммуногистохимия. Клетки NT2/A в 4-недельном возрасте наносили прямо на покровные стекла, в то время как клетки NT2/N и клетки NT2/A, культивируемые в течение 1 недели, были нанесены на покровные стекла, покрытые Geltrex® («Thermo Fischer Scientific», США). Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре, обрабатывали для пермеабиллизации в 0,2%-ном Triton X-100 в течение 20 мин и блокировали в 1%-ном BSA и 5%-ной нормальной козлиной сыворотке в PBS, pH 7,4, с 0,1%-ным Triton X-100 (PBT) в течение 1 ч при комнатной температуре. Первичные антитела разводили в PBT, содержащем 1% BSA, и инкубировали в течение ночи при 4 °C: мышинные антитела против MAP2 в разведении 1 : 500 (ab11267, «Abcam», Великобритания), мышинные антитела против виментина в разведении 1 : 300 (sc-6260, «Santa Cruz Biotechnology», США), кроличьи антитела против Ki67 в разведении 1 : 300 (ab15580, «Abcam»), кроличьи антитела против GFAP в разведении 1 : 200 (Z 0334, «Dako Cytomation», Дания). Связавшиеся первичные антитела были маркированы на протяжении 1 ч при комнатной температуре с использованием соответствующих вторичных антител: козлиные анти-кроличьи IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A-11034, «Invitrogen», США), козлиные анти-мышинные

IgG (H+L) Alexa Fluor 546 (A-11030, «Invitrogen») и козлиные анти-мышинные IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A-11029, «Invitrogen»), разведенные в 500 раз в PBT с добавлением 1% BSA. Антитела против GFAP обрабатывали препаратом биотинилированных козлиных анти-кроличьих IgG, разведенных в 500 раз (BA-1000, «Vector Laboratories», США), в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS, pH 7,4, содержащем 1% BSA, и затем окрашивали стрептавидином (Streptavidin) DyLight® 594, разведенным в 500 раз (SA-5594, «Vector Laboratories») в PBS, pH 7,4, в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра окрашивали 0,1 мг/мл диаминофенилиндола (DAPI, «Sigma-Aldrich»). Визуализацию и фотосъемку образцов выполняли на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51 с использованием программы Cytovision 3.1 («Applied Imaging Corporation», США) или на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8, снабженном программой Leica Microsystems LAS AF-TCS SP8 («Leica Microsystems», Германия).

ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR). Полученный препарат тотальной РНК обрабатывали ДНКазой I и использовали для синтеза кДНК как описано ранее [17]. Полученные кДНК использовали в качестве матриц для амплификации *OCT4* и *NEUROD1* с использованием набора КАРА 2G Fast HotStart Ready Mix («Кара Biosystems», США) и для амплификации *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* с использованием набора Power SYBR Green PCR Master Mix («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Эксперименты проводили минимум в 3 повторениях. Амплификацию в реальном времени проводили с помощью системы 7500 Real Time PCR («Applied Biosystems»). Данные по каждому образцу получали трижды и брали среднее значение полученных результатов. Относительные уровни экспрессии генов *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали относительно *GAPDH* как внутреннего контроля. Ниже указаны последовательности праймеров, используемых в настоящей работе (прямой и обратный соответственно):

OCT4: 5'-GCTTTGAGGCTCTGCAGCTT-3' и 5'-TCTCCAGGTTGCCCTCTCACT-3', *NEUROD1*: 5'-GGAAACGAACCCACTGTGCT-3' и 5'-GCCACACCAATTCGTGGTG-3', *GAPDH*: 5'-GCC-TCAAGATCATCAGCAATGC-3' и 5'-CCACGATACCAAAGTTGTTCATGG-3', *p21^{Waf1/Cip1}*: 5'-GACCACTGGAGGGTGAAT-3' и 5'-CAGGTCACATGGTCTTCCCT-3', *TP53*: 5'-CCCCTCC-TGGCCCCTGTTCATCTTC-3' и 5'-GCAGCGC-STCACAACCTCCGTCAT-3'.

Анализ TaqMan-микроРНК и обработка полученных данных. Наборы TaqMan для определения индивидуального уровня экспрессии микроРНК («Applied Biosystems») были использованы для miR-21 (Cat. No. 4427975; Assay ID 000397), miR-30d (Cat. No. 4427975; Assay ID 000420), miR-30d* (Cat. No. 4427975; Assay ID 002305), miR-124a (Cat. No. 4427975; Assay ID 000446), miR-219-5p (Cat. No. 4427975; Assay ID 000522) и miR-941 (Cat. No. 4427975; Assay ID 002183). Реакции с обратной транскрипцией проводили с помощью набора с обратной транскриптазой MultiScribe reverse transcriptase («Applied Biosystems»), как описано ранее [3]. Затем проводили количественную ПЦР с использованием набора TaqMan Universal PCR Master Mix на приборе 7500 Real Time apparatus («Applied Biosystems»), как описано ранее [3, 18]. Уровни относительной экспрессии отдельных микроРНК рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ [3] и нормализовали относительно *RNU44* (Cat. No. 4427975; Assay ID 001095) как внутреннего контроля. Все эксперименты были выполнены в трех биологических повторениях с минимум двумя техническими.

Определение выживаемости клеток. Спустя 5 дней после трансдукции с помощью конструктора anti-miR-21 или пустого вектора клетки высевали на 96-луночные культуральные планшеты с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток на лунку в случае 1-недельных клеток NT2/A и 2×10^4 клеток на лунку – в случае 4-недельных клеток NT2/A. Для определения выживаемости 1-недельных клеток NT2/A использовали МТТ-тест («Merck», США), для определения выживаемости 4-недельных клеток NT2/A – набор CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay («Promega», США). Все измерения проводили в соответствии с протоколом производителя. Для колориметрических измерений использовали микропланшетный ридер Infinite 200 PRO («Tecan», Швейцария). Все эксперименты были выполнены в шести технических повторениях и проведены в трех независимых экспериментах.

Анализ клеточной сенесцентности (старения). Чтобы определить активность SA- β -gal, клетки высевали в 24-луночные культуральные планшеты. Через 5 дней после трансдукции конструкцией anti-miR-21 или пустым вектором клетки окрашивали с помощью Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology) согласно инструкциям производителя. Вкратце, клетки промывали PBS, фиксировали и окрашивали в течение 12 ч при 37 °C раствором X-gal, содержащим β -галактозидазу. Все клетки визуализировали в одинаковых условиях с помощью фазово-контрастного микроскопа DM IL LED Inverted

Microscope, определение интенсивности окрашивания препаратом SA- β -gal проводили с помощью программы ImageJ software (National Institutes of Health, США). Все результаты были получены на основании трех независимых биологических повторов.

Предсказание генов-мишеней. Для предсказания мишеней miR-21 (hSA-miR-21-5p) нами были использованы программы TargetScan Human Release 7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/) [19], DIANA TarBase v8 (https://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex) [20] и MirDB (<http://mirdb.org/>) [21]. Эти предварительно рассчитанные данные находятся в свободном доступе онлайн. Подтвержденные или предсказанные мишени miR-21, полученные с помощью каждого из указанных выше алгоритмов, были проанализированы на пересечение с генами, для которых характерно повышение экспрессии в астроцитах при индукции клеточного старения путем облучения, как показано в работе Limbad et al. [22].

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы SPSS statistical software (версия 20). Полученные данные представлены в виде среднего значения \pm SEM на основании минимум трех независимых экспериментов. Значения *p* были рассчитаны с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеризация нейрональной *in vitro* дифференцировки плюрипотентных клеток NT2/D1 человека. Нами с помощью ретиноевой кислоты была осуществлена *in vitro* нейродифференцировка плюрипотентных клеток эмбриональной карциномы человека NT2/D1 как описано ранее [13]. Прогрессирование нейродифференцировки регистрировали по изменениям морфологии клеток (рис. 1, *a*) и уровню экспрессии специфических маркеров (рис. 1, *b*, *c*). Недифференцированные клетки NT2/D1, характеризующиеся быстрым клеточным делением и небольшим размером, росли в виде монослойной культуры (рис. 1, *a*). В этих клетках обнаруживалась экспрессия маркера плюрипотентных стволовых клеток *OCT4* (связывающийся с октамером фактор транскрипции 4) (рис. 1, *b*). После 4 недель обработки ретиноевой кислотой клетки формировали чрезвычайно плотную многослойную культуру, в которой кластеры клеток круглой формы размещались поверх очень плотного слоя прикрепленных клеток (рис. 1, *a*, +RA). Эта

многослойная клеточная культура содержала смесь популяций предшественников нейронов и глиальных клеток, как было показано ранее [13, 14]. Соответственно, в этой фазе нейродифференцировки нами был выявлен высокий уровень экспрессии маркера предшественников нейронов *NEUROD1* (фактор нейрогенной дифференцировки 1) (рис. 1, *b*). Далее мы выделили из этих многослойных культур клетки NT2/N и NT2/A (рис. 1, *a, c*) с использованием ранее разработанных протоколов [13, 14]. Нейроны и астроглиальные клетки были подтверждены фенотипически путём мониторинга экспрессии спе-

цифических белков цитоскелета. Так, в клетках NT2/N было выявлено интенсивное окрашивание белка MAP2 (белок 2, ассоциированный с микротрубочками), нейрон-специфичного белка цитоскелета, обнаруживаемого во всех телах и отростках клеток (рис. 1, *c* и *c'*, NT2/N). Для выявления клеток NT2/A использовали антитела против внутрицитоплазматических филаментов, образованных виментином и белком GFAP (фибрилярный кислый белок глиальных клеток). В соответствии с результатами работы Sandhu et al. [14] в случае 1-недельной культуры, обогащенной клетками NT2/A, нами было по-

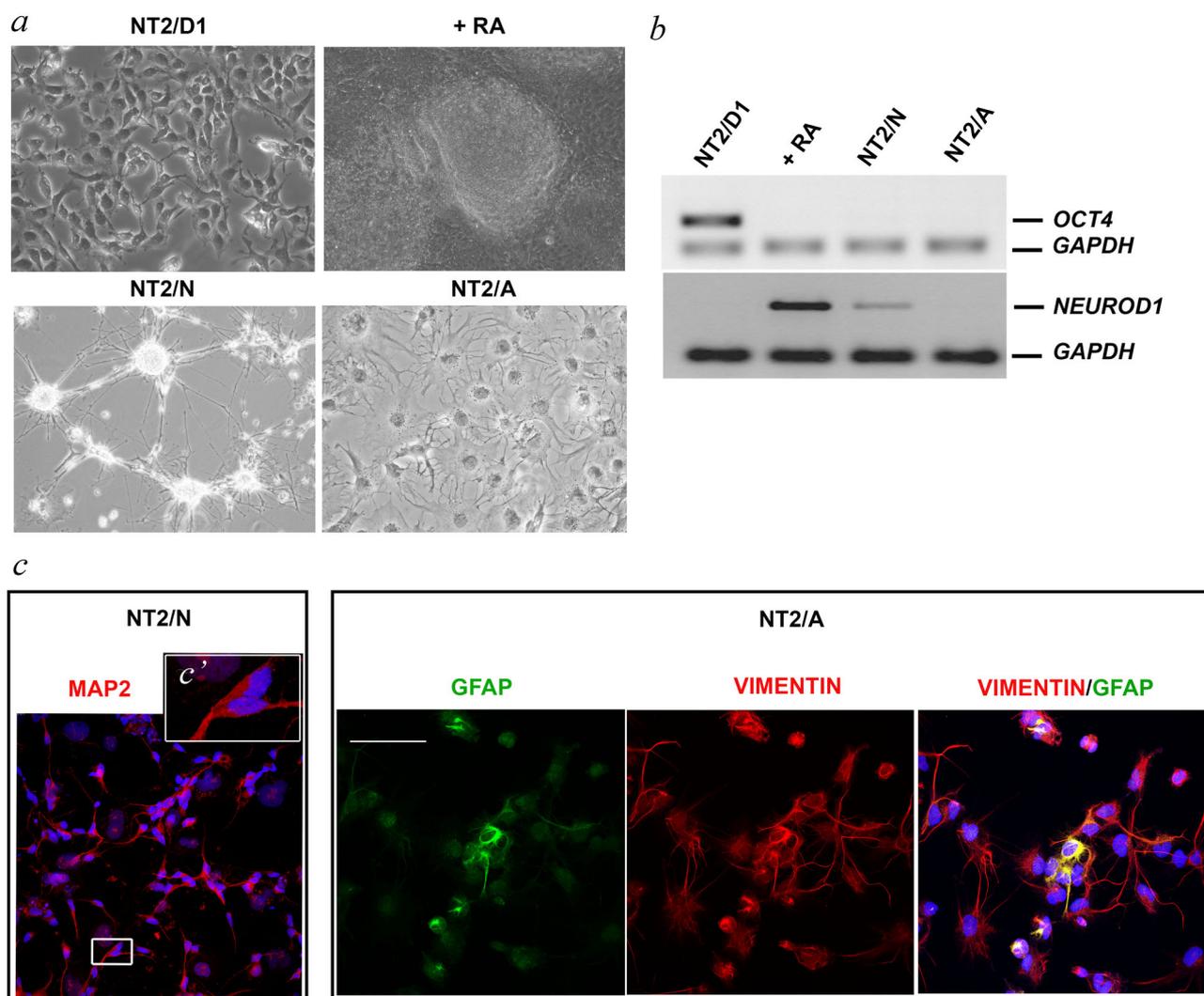


Рис. 1. *a* – Изображения, полученные с помощью фазово-контрастного микроскопа, демонстрирующие морфологические изменения, происходящие при индуцированной ретиноевой кислотой (RA) нейродифференцировке клеток NT2/D1. NT2/D1 – недифференцированные клетки; +RA – NT2/D1 после 4 недель обработки RA; NT2/N – зрелые нейроны; NT2/A – астроциты (1-недельные); 10-кратное увеличение. *b* – Полуколичественное определение уровня экспрессии *OCT4* и *NEUROD1* с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией. В качестве контроля использовали *GAPDH*. *c* – Иммуноокрашивание клеток NT2/N антителами, специфичными к MAP2 (красный), и клеток NT2/A – антителами, специфичными к белку GFAP (зеленый) и виментину (красный). Ядра клеток были контрокрашены с помощью DAPI (синий). Выделенный квадратом участок панели *c* показан в увеличенном виде на (*c'*). Шкала – 100 мкм

казано, что все изученные клетки являлись виментин-позитивными, в то время как лишь небольшая группа клеток NT2/A интенсивно окрашивалась на GFAP, маркер зрелых астроглиальных клеток (рис. 1, с, NT2/A).

Анализ уровня экспрессии отдельных микроРНК в процессе нейрональной дифференцировки клеток NT2/D1, индуцированной ретиноевой кислотой. Всесторонний анализ экспрессии микроРНК, проведенный Smith et al. [23], привел к обнаружению микроРНК, ассоциированных с отдельными фазами нейродифференцировки клеток NT2/D1, индуцированной ретиноевой кислотой. Соответственно, чтобы далее изучить эту модельную систему с точки зрения паттернов экспрессии микроРНК, нами были отобраны miR-219 и miR-30d как микроРНК, специфичные для предшественников нейронов, а также miR-124 и miR-21, характерные для нейронов и астроцитов, образующихся из клеток NT2, соответственно [23]. Кроме того, мы включили в наш анализ miR-30d*, другой член семейства miR-30, а также miR-941. Последняя представляет особый интерес, поскольку эта микроРНК является специфичной для клеток человека и имеет повышенный уровень экспрессии в клетках головного мозга, оказывая влияние на гены, вовлеченные в пути передачи сигналов нейромедиаторов [24].

После 4 недель культивирования клеток NT2/D1 с ретиноевой кислотой, максимальные уровни экспрессии были продемонстрированы для 4 из 6 проанализированных микроРНК (miR-30d, miR-30d*, miR-219 и miR-941) (рис. 2). Несмотря на значительные различия уровней экспрессии членов семейства miR-30, а именно miR-30d и miR-30d*, они продемонстрировали схожие паттерны экспрессии в ходе дифференцировки клеток NT2/D1 (рис. 2). Наивысший уровень экспрессии в клетках NT2/N и NT2/A был продемонстрирован miR-124 и miR-21 соответственно (рис. 2). Следует, однако, отметить, что в отличие от miR-124, для которой описан высокий уровень экспрессии в головном мозге и важная роль в процессе нейрогенеза как при развитии мозга, так и у взрослых индивидов [25, 26], роль miR-21 в астроцитах до сих пор не была изучена. Поэтому в своих работах мы сосредоточили внимание на изучении этой микроРНК и её роли в клетках NT2/A.

Характеризация клеток NT2/A на различных стадиях их созревания. Процесс созревания клеток NT2/A был задокументирован в виде изменений клеточной морфологии (рис. 3, а), снижения скорости пролиферации клеток (рис. 3, б, с) и экспрессии специфических маркеров (рис. 3, а, нижняя панель). Однонедель-

ные культуры клеток NT2/A состояли в основном из небольших похожих на звездочки клеток с многочисленными отростками, подобными фибриллам (рис. 3, а). Эти фибриллярные или звездчатые астроциты обнаруживались растущими поверх протоплазматических астроцитов в первые две недели культивирования клеток. В процессе дальнейшего созревания клеток NT2/A доля фибриллярных астроцитов резко снижалась, и к четвертой неделе клеточные культуры преимущественно состояли из протоплазматических астроцитов, т.е. плоских клеток с короткими цитоплазматическими отростками, простирающимися от практически круглых клеточных тел (рис. 3, а). В то время как и фибриллярные и протоплазматические клетки были виментин-позитивными, интенсивное окрашивание GFAP наблюдалось лишь в подгруппе фибриллярных астроцитов, но не в больших протоплазматических клетках (рис. 3, а, нижняя панель).

Скорость пролиферации клеток NT2/A на двух различных стадиях созревания оценивали путем оценки экспрессии Ki67, ядерного белка, ассоциированного с пролиферацией клеток (рис. 3, б). Число Ki67-меченых клеток существенно снижалось в процессе созревания клеток NT2/A (рис. 3, с). В частности, в 1-недельных культурах клеток NT2/A нами было обнаружено 66% Ki67-меченых клеток, в то время как после 4 недель созревания мы наблюдали 29% митотически активных клеток от общего количества подсчитанных клеток. Таким образом, дальнейшее созревание клеток NT2/A в течение дополнительных 3 недель сопровождается примерно двукратным снижением скорости пролиферации. Схожие фенотипические изменения в процессе созревания NT2/A были ранее описаны Sandhu et al. [14]. Следующей целью было исследование того, меняется ли уровень экспрессии miR-21 в процессе созревания клеток NT2/A. Мы обнаружили незначительное снижение уровня экспрессии miR-21 в 4-недельных клетках в сравнении с 1-недельными (рис. 3, д), что указывает в пользу того, что уровень экспрессии miR-21 остается без изменений в процессе созревания клеток NT2/A.

Снижение уровня экспрессии miR-21 влияет на пролиферацию клеток NT2/A. Для исследования влияния miR-21 на фенотипические характеристики клеток NT2/A мы снизили уровень экспрессии этой микроРНК как в незрелых, так и в зрелых клетках NT2/A. Нами была проведена трансдукция 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A конструкцией, экспрессирующей anti-miR-21, через 5 суток после чего мы определяли уровни экспрессии miR-21. Экспрессия

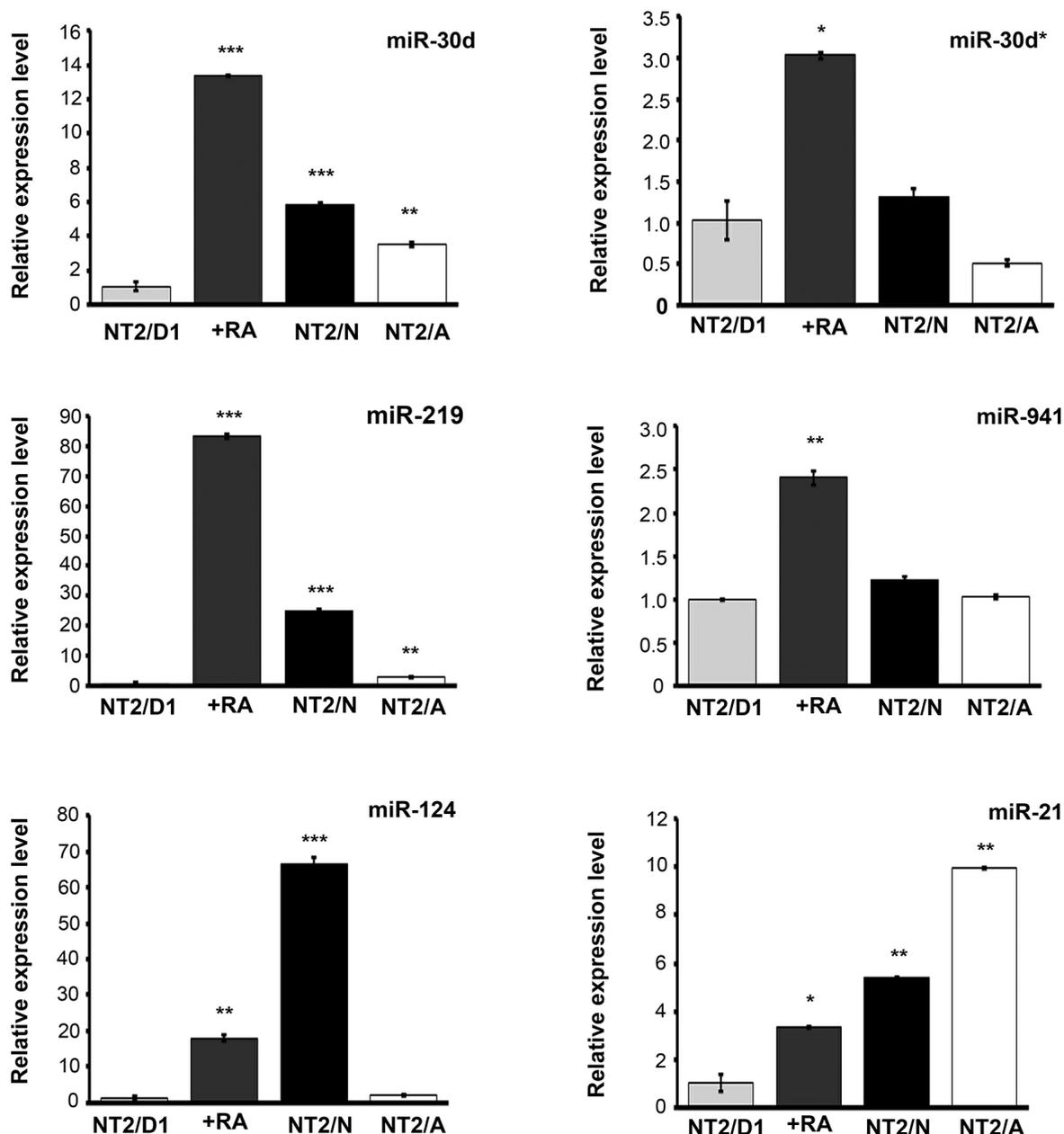


Рис. 2. Анализ экспрессии микроРНК на различных фазах индуцированной ретиноевой кислотой (RA) нейродифференцировки клеток NT2/D1. NT2/D1 – недифференцированные клетки; +RA – NT2/D1 после 4 недель их обработки RA; NT2/N – зрелые нейроны; NT2/A – астроциты (1-недельные). Относительные уровни экспрессии микроРНК рассчитывали на основе сравнения с уровнем экспрессии в недифференцированных клетках NT2/D1, который был принят за единицу. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

указанной микроРНК снижалась до значений $0,39 \pm 0,09$ (в 1-недельной культуре клеток NT2/A) и $0,60 \pm 0,03$ (в 4-недельных культурах клеток NT2/A) в сравнении с уровнем miR-21 в контрольных клетках, трансдуцированных пустым вектором, который был взят за единицу (рис. 4, a).

Вначале мы изучили влияние снижения уровня экспрессии miR-21 на выживаемость

клеток NT2/A на обеих стадиях созревания. Оценку выживаемости клеток NT2/A определяли через 5 дней после трансдукции с использованием реагента МТТ в случае 1-недельных клеток NT2/A и с применением MTS – в случае зрелых клеток NT2/A (4 недели культивирования). Снижение уровня экспрессии miR-21 вызвало значительное снижение выживаемости клеток NT2/A (рис. 4, b). В частности, выживаемость

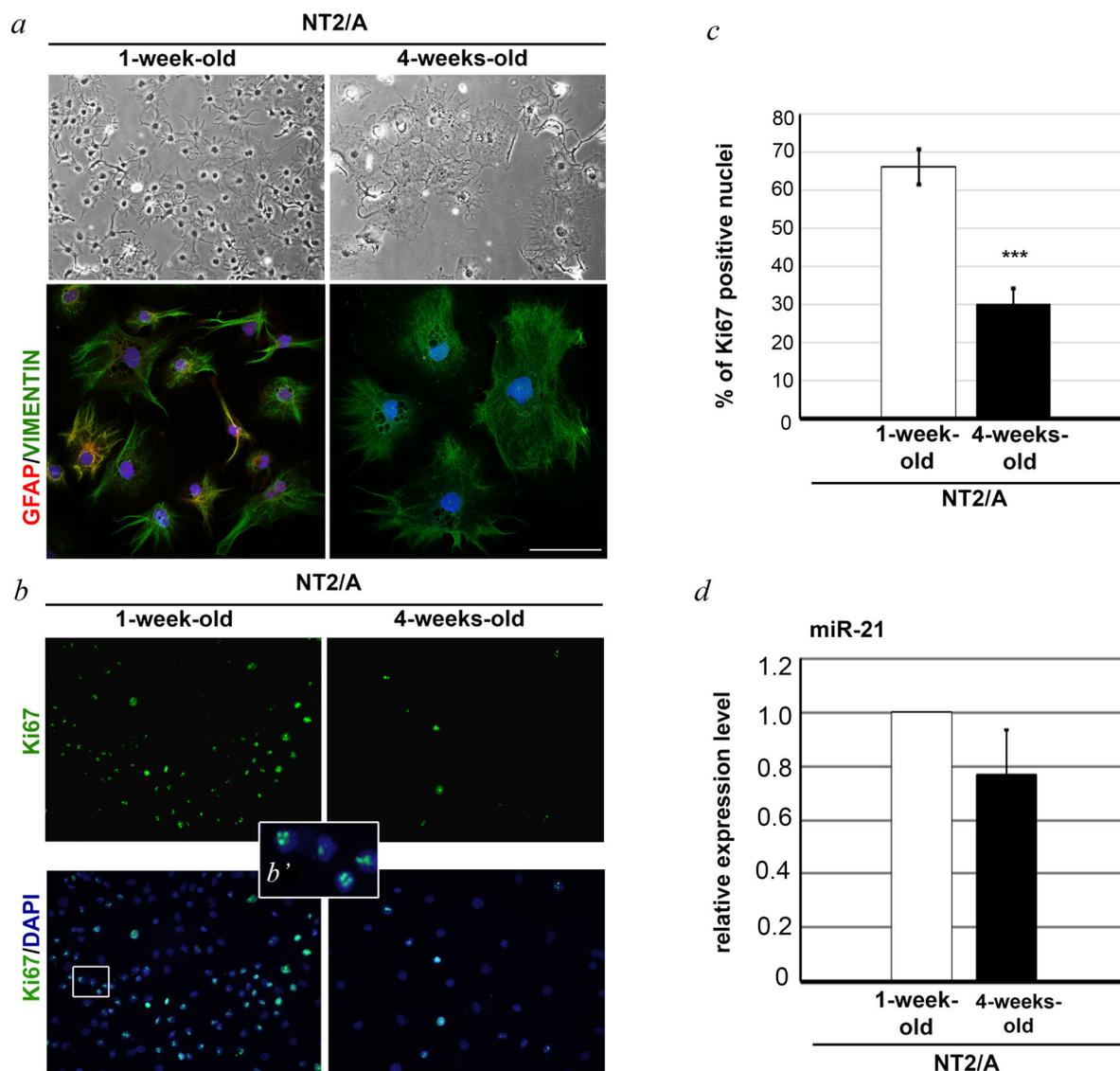


Рис. 3. *a* – Изображения, полученные с помощью фазово-контрастного микроскопа, демонстрируют морфологические различия между 1-недельными и 4-недельными клетками NT2/A (верхняя панель) при увеличении в 10 раз. Иммуноокрашивание с помощью антител против виментина (зеленый) и белка GFAP (красный) (нижняя панель). Клеточные ядра окрашены с помощью DAPI (синий). Шкала – 100 мкм. *b* – Определение экспрессии Ki-67 (зеленый) с помощью иммунофлуоресценции, увеличение в 20 раз. Выделенный квадратом участок панели *b* (слева) показан в увеличенном виде на *b'*. *c* – Статистический анализ клеток, иммунопозитивных в отношении Ki-67 в 1-недельных и 4-недельных культурах клеток NT2/A. Процент Ki-67-позитивных клеток рассчитывали относительно общего количества клеток, меченых DAPI (минимум 100 клеток). *d* – Относительный уровень экспрессии miR-21 в 4-недельных клетках NT2/A был рассчитан в сравнении с уровнем экспрессии в 1-недельной культуре клеток NT2/A, который был взят за единицу. *** $p \leq 0,001$

мость клеток снижалась на 60% и 40% для 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A соответственно (рис. 4, *b*). Затем мы оценивали экспрессию Ki-67 путем регистрации иммунофлуоресценции для определения влияния уровня экспрессии miR-21 на скорость пролиферации клеток NT2/A (рис. 4, *c*). Как показано на рис. 4, *d*, количество Ki-67-позитивных клеток снизилось примерно на 30% и 20% в 1-недель-

ных и 4-недельных культурах клеток NT2/A соответственно. Таким образом, обнаруженное снижение выживаемости клеток NT2/A вызвано – по крайней мере, частично – уменьшением скорости пролиферации клеток.

Снижение уровня экспрессии miR-21 индуцирует старение клеток NT2/A. Для определения того, сопровождалась ли остановка роста, наблюдаемая после трансдукции 1-недельных и

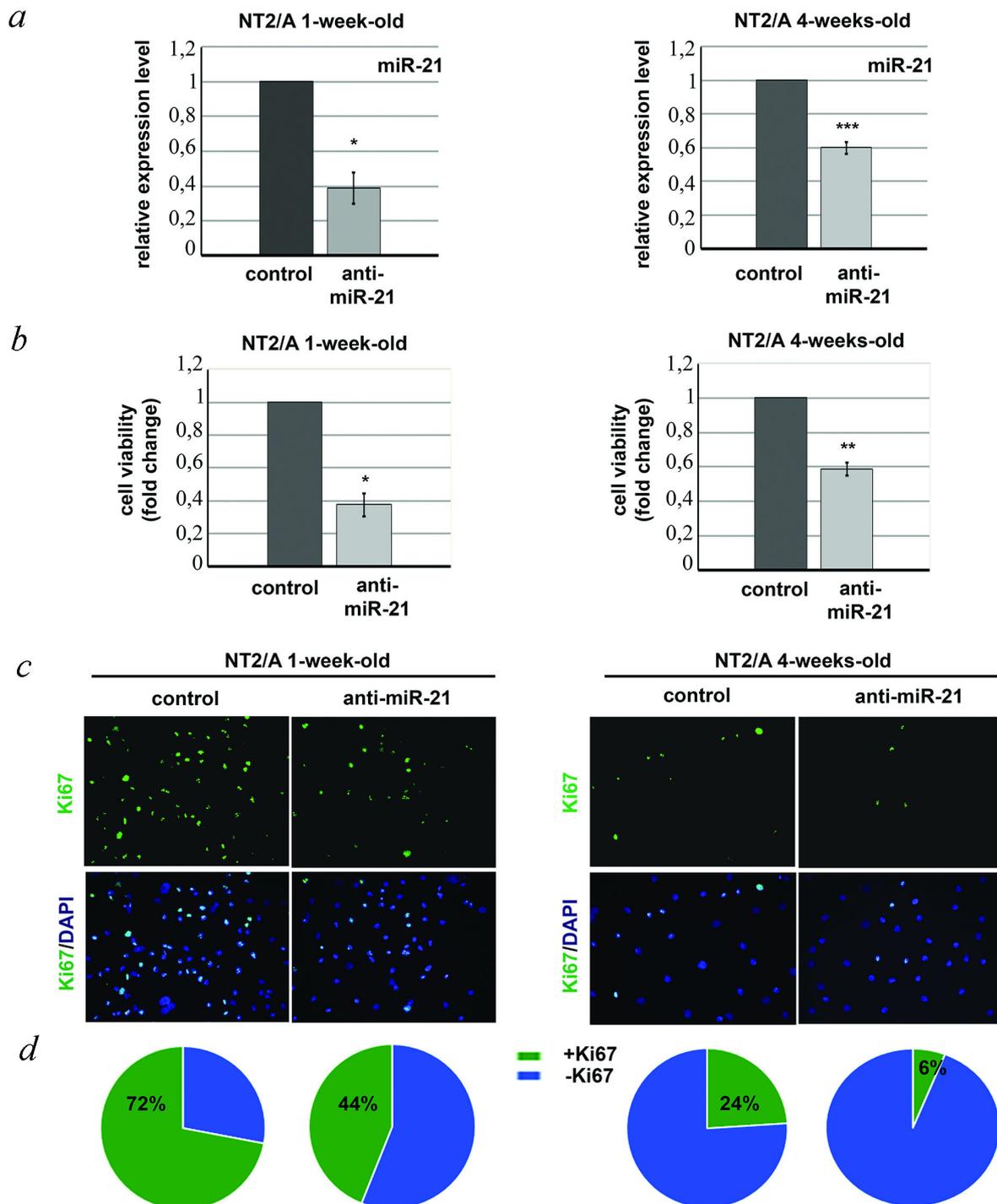


Рис. 4. *a* – Относительное снижение уровня экспрессии miR-21 в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A после их трансдукции конструкцией anti-miR-21 было рассчитано относительно уровня экспрессии miR-21 в контроле (клетки, трансдуцированные пустым вектором), который был приравнен к единице. *b* – Относительные значения выживаемости 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A после трансдукции конструкцией anti-miR-21 рассчитывали относительно выживаемости клеток, трансдуцированных пустым вектором, которая была принята за единицу. *c* – Репрезентативные изображения иммуноокрашивания белка Ki-67 (зеленый) 1-недельных (панель слева) и 4-недельных (панель справа) клеток NT2/A, трансдуцированных конструкцией anti-miR-21 или пустым вектором (контроль). Ядра клеток были контрокрашены препаратом DAPI (синий), 20-кратное увеличение. *d* – Статистическая обработка Ki-67-иммунопозитивных 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A после трансдукции клеток конструкцией anti-miR-21 или пустым вектором. Процент Ki-67-иммунопозитивных клеток рассчитывали относительно общего количества клеток, меченых DAPI (минимум 180 клеток). Данные получены из двух независимых экспериментов. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

4-недельных клеток NT2/A конструкцией anti-miR-21, изменениями уровней экспрессии ингибиторов клеточного цикла, мы проанализировали экспрессию *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* (рис. 5, *a*, *b*). Уровни экспрессии обоих анализируемых ингибиторов клеточного цикла возрастали после трансдукции клеток anti-miR-21. Повышение уровня экспрессии *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* было заметно как в 1-недельных, так и в 4-недельных куль-

турах клеток NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21 (рис. 5, *a*). Повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла p21 и p53, а также остановка роста клеток свидетельствуют об инициации клеточного старения [12].

Чтобы определить, влияет ли снижение уровня экспрессии miR-21 на процесс клеточного старения, мы проанализировали активность SA- β -gal в 1-недельных и 4-недельных клетках

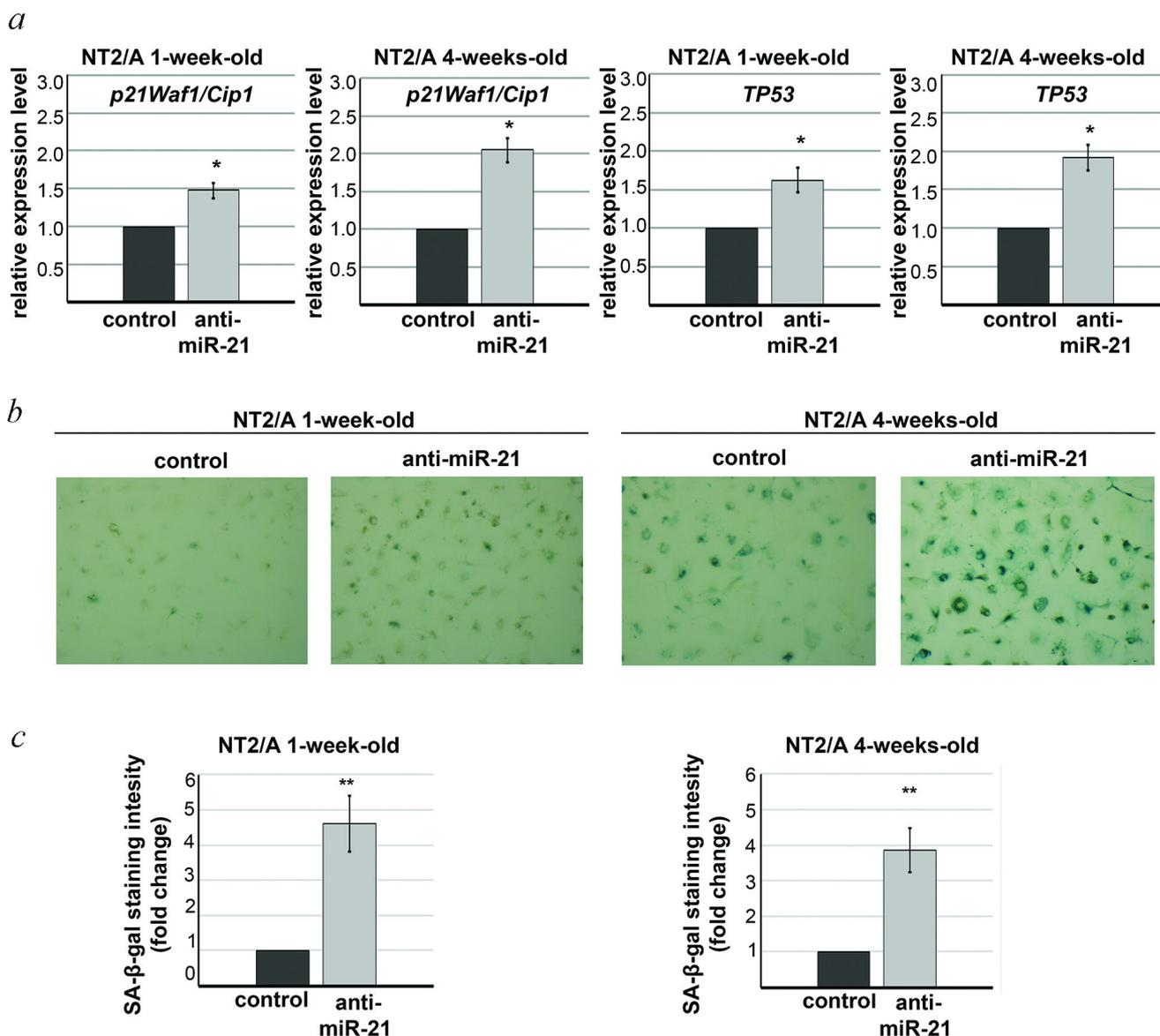


Рис. 5. *a* – Анализ экспрессии *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A после их трансдукции конструкцией anti-miR-21. Относительные уровни экспрессии p21 и p53 в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A после их трансдукции anti-miR-21 рассчитывали относительно уровня экспрессии p21 и p53 в контрольных клетках (трансдуцированных пустым вектором), который был принят за единицу. *b* – Репрезентативные изображения окрашивания SA- β -gal (зеленый) 1-недельных и 4-недельных клеток NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21 или пустым вектором. *c* – Относительное увеличение интенсивности окрашивания SA- β -gal в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21, было рассчитано путём сравнения с интенсивностью окрашивания SA- β -gal в клетках, трансдуцированных пустым вектором, которая была приравнена к единице. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

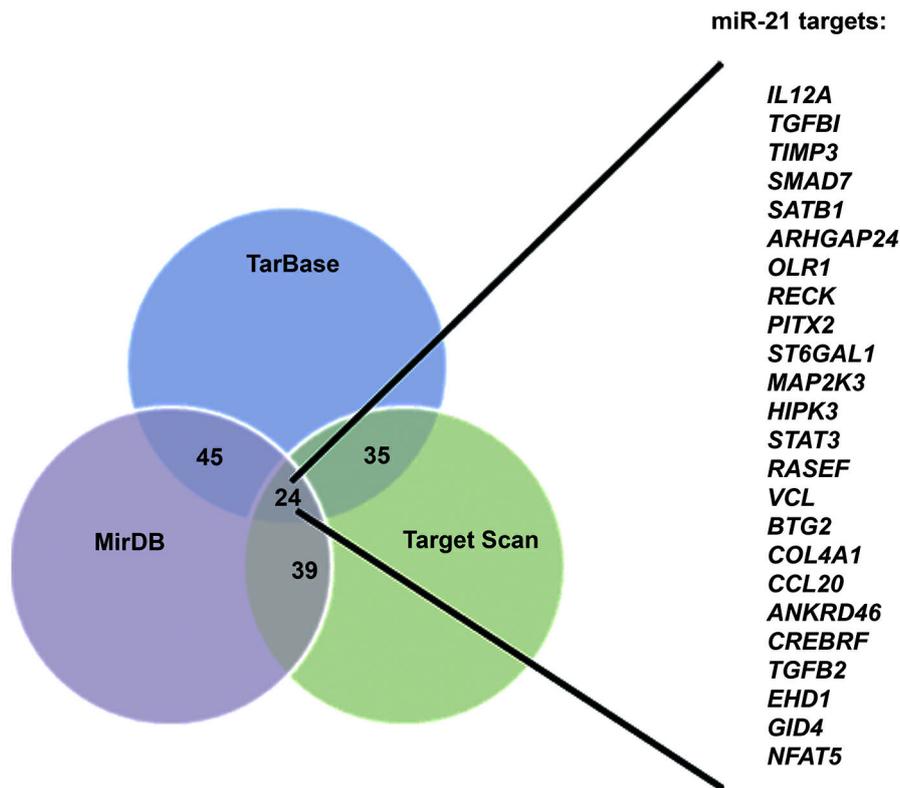


Рис. 6. Диаграмма Венна, показывающая, что предсказанные гены-мишени miR-21 характеризуются повышенной экспрессией в стареющих астроцитах [22] и выявляются всеми 3 алгоритмами – TargetScan, TarBase и MirDB. Показаны 24 гена, присутствующие в выдаче всех трех алгоритмов

NT2/A после их трансдукции конструкцией anti-miR-21. Во-первых, мы наблюдали, что количество стареющих клеток NT2/A увеличивалось в процессе их созревания (рис. 5, *b*, нижняя панель, сравнение контрольных/1-недельных и контрольных/4-недельных культур клеток NT2/A). Кроме того, было также обнаружено интенсивное окрашивание SA- β -gal как в 1-недельных, так и в 4-недельных клетках NT2/A, трансдуцированных anti-miR-21 (рис. 5, *b*, нижняя панель). Определение интенсивности окрашивания SA- β -gal продемонстрировало, что снижение уровня экспрессии miR-21 вызывает увеличение активности SA- β -gal в 1-недельных и 4-недельных клетках NT2/A в 4,6 и 3,8 раза соответственно в сравнении с клетками, трансдуцированными пустым вектором (рис. 5, *c*).

В целом, необратимая остановка клеточного роста в сочетании с повышенной экспрессией ингибиторов клеточного цикла p21 и p53 и повышенной активностью SA- β -gal свидетельствовали в пользу того, что снижение уровня экспрессии miR-21 вызывает старение как 1-недельных, так и 4-недельных клеток NT2/A.

Анализ *in silico* ассоциированных со старением генов, являющихся мишенями miR-21. Масштаб-

ный анализ результатов секвенирования РНК, проведенный Limbad et al. [22], выявил значительные изменения в транскриптом стареющих в результате воздействия облучения астроцитов. Было показано, что уровень экспрессии многих генов, играющих важную роль в нормальном функционировании астроцитов, снижен, в то время как уровень экспрессии многочисленных провоспалительных генов был, наоборот, повышен [22]. Чтобы выявить потенциальные мишени miR-21 среди генов с повышенной экспрессией, нами был проведен анализ *in silico* с использованием различных онлайн-сервисов для предсказания: TargetScan, TarBase и MirDB. Полученные нами результаты продемонстрировали, что многие гены с повышенной экспрессией в стареющих в результате облучения астроцитах были предсказаны в качестве мишеней miR-21 (Приложение, табл. S1). Среди них оказалось 24 гена, для которых предсказания всех онлайн-программ совпадали (рис. 6). Эти данные дали дополнительное подтверждение полученным нами ранее результатам, указывающим на miR-21 как потенциальный регулятор клеточного старения астроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкомасштабное профилирование экспрессии микроРНК в клетках NT2/D1 человека в процессе индуцированного RA перехода из предшественников в полностью дифференцированные нейрональные клетки продемонстрировано, что эта модельная система подходит для изучения специфических функций микроРНК в процессе развития нервной системы человека [23]. В соответствии с этими масштабными исследованиями экспрессии микроРНК нами было показано, что miR-219 и miR-30d являются специфичными для стадий предшественников нейронов при индуцированной RA дифференцировке клеток NT2/D1. Аналогичный вывод можно сделать для miR-941, специфичной для человека (рис. 2). Высокий уровень экспрессии miR-941 спустя 4 недели после обработки клеток NT2/D1 ретиноевой кислотой может быть связан с дифференцировкой клеток, т.к. было показано, что мишенями этой специфичной для человека микроРНК являются гены, вовлеченные в сигнальные пути, необходимые для клеточной дифференцировки [24]. Обнаруженные нами высокие уровни экспрессии miR-124 и miR-21 в образующихся из клеток NT2 нейронах и астроцитах соответственно (рис. 2) также соответствовали данным, опубликованным Smith et al. [23]. Полученные в указанной работе результаты свидетельствовали о высоких уровнях экспрессии этих микроРНК в NT2-дифференцированных клетках и соответствующих им первичных культурах клеток человека [23].

Клетки NT2/A продемонстрировали фенотипические изменения в процессе созревания в условиях *in vitro* (рис. 3), включая, в частности, наличие виментина даже в зрелых астроцитах, что соответствовало результатам предыдущего исследования [14]. Количество участвующих в клеточном цикле Ki-67-меченых клеток значительно снижалось по мере старения культур клеток NT2/A (рис. 3, *b, c*), что, согласно Sandhu et al. [14], обусловлено остановкой клеточного цикла в фазе G₀/G₁. И хотя эти клетки сохраняли способность к возобновлению пролиферации после повреждения [14], полученные нами результаты свидетельствуют о том, что снижение скорости роста культур NT2/A было также связано с индукцией процесса клеточного старения, ассоциированного с повышенной активностью SA-β-gal в 4-недельных культурах по сравнению с 1-недельными культурами клеток NT2/A (рис. 5, *b*). Сделанный нами вывод согласуется с тем, что культуры NT2/A обладают ограниченной продолжитель-

ностью жизни (от 6 до 10 пассажей), что было показано ранее в работе Sandhu et al. [14].

Роль miR-21 в головном мозге взрослого организма в основном рассматривалась в контексте поражения спинного мозга (SCI). Было высказано предположение, что указанная микроРНК может работать в качестве регулятора функционирования астроцитов, способствуя их восстановлению после SCI как *in vitro*, так и *in vivo* [6, 7]. В частности, показано, что повышение экспрессии miR-21 после SCI способствует пролиферации астроцитов и ингибированию их апоптоза [6]. В соответствии с этими данными нами было показано, что снижение уровня экспрессии miR-21 приводит к снижению пролиферации клеток NT2/A. Интересно, что данный эффект отмечался не только в 1-недельных культурах клеток NT2/A, состоящих преимущественно из митотически активных клеток, но также и в 4-недельных культурах, где большинство клеток уже достигли фазы покоя (рис. 4, *c, d*). Такая активность miR-21, способствующая пролиферации клеток, уже была описана во многих других клеточных контекстах, преимущественно в различных типах злокачественных опухолей, включая глиобластому [27, 28]. Таким образом, достаточно неожиданным является факт того, что повышенная экспрессия miR-21 также наблюдается в зрелых культурах клеток NT2/A (рис. 3, *d*), несмотря на то что количество клеток с нормальным клеточным циклом (*cycling cells*) значительно уменьшилось. Мы можем предположить, что астроциты должны поддерживать определенный уровень экспрессии miR-21 в процессе созревания, чтобы предотвратить преждевременное старение клеток. Действительно, остановка роста клеток, индуцированная снижением уровня экспрессии miR-21, сопровождалась повышением экспрессии *p21^{Waf1/Cip1}* и *TP53* (рис. 5, *a*). Повышение уровня экспрессии этих ингибиторов клеточного цикла, сопряженное с повышенной активностью SA-β-gal, являются четкими индикаторами того, что снижение экспрессии miR-21 индуцирует клеточное старение (рис. 5, *b, c*). По нашим сведениям, это первые данные, демонстрирующие связь между miR-21 и старением астроцитов. Сходные результаты были получены и на других клеточных моделях [29, 30]. Изменения базового уровня экспрессии miR-21 часто коррелируют с различными патологиями ЦНС, что наиболее ярко видно на примере глиобластомы [4]. Кроме того, показано, что уровень miR-21 в процессе старения существенно изменяется как в тканях, так и в крови, и ассоциируется с различными воспалительными процессами и возрастными

заболеваниями [8]. В целом, мы можем предположить, что поддержание базового уровня экспрессии miR-21 играет важную роль в поддержании нормальной физиологической активности астроцитов.

Ассоциированная с клеточным старением дисфункция астроцитов имеет серьезные последствия в контексте старения мозга и развития нейродегенеративных заболеваний [31]. Неблагоприятное воздействие сенесцентных астроцитов на свое микроокружение состоит в основном в приобретенном провоспалительном секреторном фенотипе [32]. Кроме того, описаны и другие изменения в астроцитах, вызванные клеточным старением, которые могут иметь отношение к их нейротоксичности. Так, снижение уровня калия и транспортеров глутамата с последующим снижением защиты нейронов может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера и подобных типов деменции [22, 31, 33].

В нашей работе было выявлено *in silico* 24 гена, являющихся мишенями miR-21, которые, предположительно, связаны со старением (рис. 6). Также было показано, что в астроцитах человека повышается экспрессия некоторых из этих потенциальных генов-мишеней miR-21 (*TIMP3*, *TGFB1*, *IL12A*, *RECK*, *VCL*, *COL4A1* и *EHD1*) в процессе индуцированного окислительным стрессом клеточного старения [33]. Более того, для некоторых из указанных генов (*TIMP3*, *RECK*, *SMAD7*, *SATB1*, *PITX2*, *MAP2K3*, *BTG2*, *CCL20* и *ANKRD46*) была экспериментально подтверждена их роль в качестве непосредственных мишеней miR-21 в различных типах клеток [34–41]. Наши данные, указывающие на регуляторную роль miR-21 в процессе

старения астроцитов, также подтверждают полученные ранее результаты. Интересно отметить, что некоторые предсказанные мишени miR-21, представленные на рис. 6, включают гены, имеющие отношение к ассоциированному со старением секреторному фенотипу, среди них интерлейкин *IL12A*, цитокин *CCL20*, фактор ангиогенеза *TGFB* и ингибиторы металлопротеаз *TIMP3* и *RECK*. Тем не менее для исследования miR-21-ассоциированных механизмов, лежащих в основе старения астроцитов, необходимо проведение функционального анализа. Как уже обсуждалось ранее, сенесцентные астроциты ассоциированы с различными патологиями ЦНС, поэтому выявление ассоциированных с микроРНК механизмов, лежащих в основе процесса старения астроцитов, могут иметь практическое значение. Новые микроРНК-ассоциированные терапевтические стратегии могут предотвратить переход клеток в сенесцентное состояние и способствовать улучшению клинических исходов.

Финансирование. Настоящая работа была выполнена при поддержке Министерства образования, науки и развития технологий Республики Сербия (гранты № 451-03-68/2020-14/200042 и 451-03-9/2021-14/200042), программы IBRO/PERC InEurope Short Stay Grants и Сербской Академии наук и искусств (грант № 01-2021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В настоящей статье не содержится описания исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rajman, M., and Schratt, G. (2017) MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners, *Development*, **144**, 2310-2322.
- Qureshi, I. A., and Mehler, M. F. (2012) Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 528-541.
- Anastasov, N., Hofig, I., Vasconcellos, I. G., Rappl, K., Braselmann, H., et al. (2012) Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells, *Radiat. Oncol.*, **7**, 206.
- Chan, J. A., Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res.*, **65**, 6029-6033.
- Zhang, W. M., Zhang, Z. R., Yang, X. T., Zhang, Y. G., and Gao, Y. S. (2018) Overexpression of miR21 promotes neural stem cell proliferation and neural differentiation via the Wnt/betacatenin signaling pathway *in vitro*, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 330-335.
- Liu, R., Wang, W., Wang, S., Xie, W., Li, H., and Ning, B. (2018) microRNA-21 regulates astrocytic reaction post-acute phase of spinal cord injury through modulating TGF-beta signaling, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1474-1488.
- Bhalala, O. G., Pan, L., Sahni, V., McGuire, T. L., Gruner, K., et al. (2012) microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury, *J. Neurosci.*, **32**, 17935-17947.
- Olivieri, F., Prattichizzo, F., Giuliani, A., Maticchione, G., Rippo, M. R., et al. (2021) miR-21 and miR-146a: the microRNAs of inflammaging and age-related diseases, *Ageing Res. Rev.*, **70**, 101374.
- Verkhatsky, A., and Nedergaard, M. (2018) Physiology of astroglia, *Physiol. Rev.*, **98**, 239-389.

10. Meldolesi, J. (2020) Astrocytes: news about brain health and diseases, *Biomedicines*, **8**, 394, doi: 10.3390/biomedicines8100394.
11. Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y., and Morales, L. (2011) Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury, *Neurosci. Res.*, **71**, 107-113.
12. Cohen, J., and Torres, C. (2019) Astrocyte senescence: evidence and significance, *Aging Cell*, **18**, e12937.
13. Pleasure, S. J., Page, C., and Lee, V. M. (1992) Pure, post-mitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons, *J. Neurosci.*, **12**, 1802-1815.
14. Sandhu, J. K., Sikorska, M., and Walker, P. R. (2002) Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells, *J. Neurosci. Res.*, **68**, 604-614.
15. Andrews, P. W. (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*, *Dev. Biol.*, **103**, 285-293.
16. Radulovic, V., Heider, T., Richter, S., Moertl, S., Atkinson, M. J., and Anastasov, N. (2017) Differential response of normal and transformed mammary epithelial cells to combined treatment of anti-miR-21 and radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **93**, 361-372.
17. Popovic, J., Stanisavljevic, D., Schwirtlich, M., Klajn, A., Marjanovic, J., and Stevanovic, M. (2014) Expression analysis of SOX14 during retinoic acid induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells and assessment of the effect of its ectopic expression on SOXB members in HeLa cells, *PLoS One*, **9**, e91852.
18. Kramer, M. F. (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **Chapter 15**, Unit 15.10, doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
19. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., and Bartel, D. P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs, *Elife*, **4**, e05005, doi: 10.7554/eLife.05005.
20. Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., et al. (2018) DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D239-D245.
21. Liu, W., and Wang, X. (2019) Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data, *Genome Biol.*, **20**, 18.
22. Limbad, C., Oron, T. R., Alimirah, F., Davalos, A. R., Tracy, T. E., et al. (2020) Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons, *PLoS One*, **15**, e0227887.
23. Smith, B., Treadwell, J., Zhang, D., Ly, D., McKinnell, I., et al. (2010) Large-scale expression analysis reveals distinct microRNA profiles at different stages of human neurodevelopment, *PLoS One*, **5**, e11109.
24. Hu, H. Y., He, L., Fominykh, K., Yan, Z., Guo, S., et al. (2012) Evolution of the human-specific microRNA miR-941, *Nat. Commun.*, **3**, 1145.
25. Cheng, L. C., Pastrana, E., Tavazoie, M., and Doetsch, F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche, *Nat. Neurosci.*, **12**, 399-408.
26. Kawahara, H., Imai, T., and Okano, H. (2012) MicroRNAs in neural stem cells and neurogenesis, *Front. Neurosci.*, **6**, 30.
27. Gaur, A. B., Holbeck, S. L., Colburn, N. H., and Israel, M. A. (2011) Downregulation of Pdc4 by miR-21 facilitates glioblastoma proliferation *in vivo*, *Neuro Oncol.*, **13**, 580-590.
28. Lou, Y., Yang, X., Wang, F., Cui, Z., and Huang, Y. (2010) MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein, *Int. J. Mol. Med.*, **26**, 819-827.
29. Savickiene, J., Baronaite, S., Zentelyte, A., Treigyte, G., and Navakauskiene, R. (2016) Senescence-associated molecular and epigenetic alterations in mesenchymal stem cell cultures from amniotic fluid of normal and fetus-affected pregnancy, *Stem Cells Int.*, **2016**, 2019498.
30. Marasa, B. S., Srikantan, S., Martindale, J. L., Kim, M. M., Lee, E. K., et al. (2010) MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence, *Aging (Albany NY)*, **2**, 333-343.
31. Baker, D. J., and Petersen, R. C. (2018) Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives, *J. Clin. Invest.*, **128**, 1208-1216.
32. Chinta, S. J., Woods, G., Rane, A., Demaria, M., Campisi, J., and Andersen, J. K. (2015) Cellular senescence and the aging brain, *Exp. Gerontol.*, **68**, 3-7.
33. Crowe, E. P., Tuzer, F., Gregory, B. D., Donahue, G., Gosai, S. J., et al. (2016) Changes in the transcriptome of human astrocytes accompanying oxidative stress-induced senescence, *Front. Aging Neurosci.*, **8**, 208.
34. Ahmed, M. I., Pickup, M. E., Rimmer, A. G., Alam, M., Mardaryev, A. N., et al. (2019) Interplay of microRNA-21 and SATB1 in epidermal keratinocytes during skin aging, *J. Invest. Dermatol.*, **139**, 2538-2542 e2532.
35. Cui, M., Zhang, M., Liu, H. F., and Wang, J. P. (2017) Effects of microRNA-21 targeting PITX2 on proliferation and apoptosis of pituitary tumor cells, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **21**, 2995-3004.
36. Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C. C., Burchard, J., et al. (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 5369-5380.
37. Liu, M., Wu, H., Liu, T., Li, Y., Wang, F., et al. (2009) Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma, *Cell Res.*, **19**, 828-837.
38. Marts, L. T., Green, D. E., Mills, S. T., Murphy, T., and Sueblinvong, V. (2017) MiR-21-mediated suppression of Smad7 induces TGFbeta1 and can be inhibited by activation of Nrf2 in alcohol-treated lung fibroblasts, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **41**, 1875-1885.
39. Yan, L. X., Wu, Q. N., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liao, D. Z., et al. (2011) Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, *in vitro* migration and *in vivo* tumor growth, *Breast Cancer Res.*, **13**, R2.
40. Yao, T., and Lin, Z. (2012) MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 248-260.
41. Yao, X., Wang, Y., and Zhang, D. (2018) microRNA-21 Confers Neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury and alleviates blood-brain barrier disruption in rats via the MAPK signaling pathway, *J. Mol. Neurosci.*, **65**, 43-53.

INHIBITION OF miR-21 PROMOTES CELLULAR SENESCENCE IN NT2-DERIVED ASTROCYTES

Vanda Balint¹, Danijela Stanisavljevic-Ninkovic¹, Natasa Anastasov², Stefan Lazic¹,
Natasa Kovacevic-Grujicic¹, Milena Stevanovic^{1,3,4}, and Andrijana Lazic^{1*}

¹ Laboratory for Human Molecular Genetics, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,
University of Belgrade, 11042 Belgrade, Serbia; e-mail: andrijanak@imgge.bg.ac.rs

² Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health,
Institute of Biological and Medical Imaging, 85764 Neuherberg, Germany

³ Faculty of Biology, University of Belgrade, 11158 Belgrade, Serbia

⁴ Serbian Academy of Sciences and Arts, 11000 Belgrade, Serbia

Astrocytes are the main homeostatic cells in the central nervous system (CNS). They provide mechanical, metabolic and trophic support to neurons and disruption of their physiological roles or the acquisition of senescence-associated phenotype can contribute to the CNS dysfunction and pathology. However, molecular mechanisms underlying the complex physiology of astrocytes are insufficiently explored. Recent studies have shown that miRNAs are involved in the regulation of astrocyte function through different mechanisms. Although miR-21 has been reported as an astrocytic miRNA with an important role in astrogliosis, no link between this miRNA and cellular senescence of astrocytes has been reported. To address the role of miR-21 in astrocytes, with special focus on cellular senescence, we used NT2-derived astrocytes (NT2/A). We down-regulated miR-21 expression in both immature and mature NT2/A by antisense technology. Our results revealed that miR-21 down-regulation induced growth arrest and premature cellular senescence, indicated by senescence hallmarks including increased expression of cell cycle inhibitors p21 and p53 and augmented senescence-associated β -galactosidase activity. Additionally, our *in silico* analyses revealed that many of the genes, previously shown to be up-regulated in irradiation-induced senescent astrocytes, were predicted miR-21 targets. Taken together, our results point to miR-21 as a potential regulator of astrocyte senescence. To the best of our knowledge, these are the first data showing the link between miR-21 and cellular senescence of astrocytes. Since senescent astrocytes are associated with different CNS pathologies, development of novel therapeutic strategies based on miRNA manipulation could prevent the senescent state and may improve the physiological outcome.

Keywords: miR-21, astrocytes, NT2/D1, senescence