

## МЕХАНИЗМЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

УДК 576.08;57.085.23;577.2

### МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

© 2021 г. А. В. Кузнецова<sup>а</sup>, \*, Л. А. Ржанова<sup>а</sup>, М. А. Александрова<sup>а</sup>

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

\*e-mail: avkuzn@list.ru

Поступила в редакцию 15.10.2020 г.

После доработки 20.12.2020 г.

Принята к публикации 26.12.2020 г.

Дедифференцировка и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) человека, а также участие клеток в неоваскуляризации сетчатки и хориоидеи лежит в основе развития различных офтальмологических заболеваний, которые приводят к серьезной потере зрения. Понимание клеточно-молекулярных механизмов, участвующих в регуляции дифференцировки клеток РПЭ, а также выявление роли клеток РПЭ в ангиогенезе глаз, поможет определить новые терапевтические мишени для лечения офтальмопатологии. Открытие того, что короткие некодирующие РНК – малые интерферирующие РНК (siRNAs) и микроРНК (miRNAs) – участвуют в регуляции генов, способствовало появлению исследований, направленных на изучение роли siRNAs в ингибировании экспрессии генов в клетках РПЭ, задействованных в ангиогенезе глаз, а также выявления роли miRNAs в регуляции дифференцировки и ЭМП клеток РПЭ. Возможность локальной доставки коротких некодирующих РНК непосредственно в глаз может быть полезным в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний.

**Ключевые слова:** ретинальный пигментный эпителий, siRNA, miRNA, эпителиально-мезенхимальный переход, ангиогенез, VEGF, хориоидальная неоваскуляризация, неоваскулярные заболевания глаз, витреоретинальные заболевания, возрастная макулярная дегенерация

**DOI:** 10.31857/S0475145021030058

#### ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) обеспечивает необходимую поддержку как фоторецепторным клеткам нейральной сетчатки, так и сосудистой оболочке глаза. Повреждение клеток РПЭ человека лежит в основе развития различных офтальмологических заболеваний, которые приводят к серьезной потере зрения. С одной стороны, дедифференцировка и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток РПЭ играет ключевую роль в патогенезе таких заболеваний, как пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) и пролиферативная диабетическая ретинопатия (Adijanto et al., 2012; Chen et al., 2014; Li et al., 2016b; Kaneko, Terasaki, 2017; Cui et al., 2019). С другой, участие клеток РПЭ в патологическом ангиогенезе глаз – в неоваскуляризации сетчатки и хориоидеи – лежит в основе внутриглазных неоваскулярных заболеваний, таких как диабетическая ретинопатия и влажная форма возрастной макулярной дегенерации (ВМД) (Chen et al., 2013; Yang et al., 2015; Askou et al., 2015; Cabral et al., 2017). Понимание клеточно-молекулярных механизмов, задействованных в регуляции дифферен-

цировки клеток РПЭ, а также выявление их роли в ангиогенезе глаз, поможет определить новые терапевтические мишени для лечения указанных заболеваний.

Открытие процесса РНК-интерференции (англ. RNAi), в результате которого малые интерферирующие РНК (англ. small interfering RNAs, siRNAs) могут заглушать или подавлять экспрессию определенных генов после транскрипции, и того, что некодирующая ДНК (англ. non-coding DNA) или “мусорная” ДНК (англ. junk DNA) транскрибируется, и среди этих транскриптов микроРНК (англ. microRNAs, miRNAs) могут подавлять трансляцию с информационных РНК (англ. messenger RNA, мРНК), способствовало появлению исследований, направленных на выявление роли малых некодирующих РНК в норме и при патологии различных органов и тканей, а также в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра заболеваний (Lam et al., 2015; Ahmadzada et al., 2018), включая заболевания глаз (Donato et al., 2018).

siRNAs и miRNAs имеют много общего, но их механизмы действия и клинические применения

различны (Lam et al., 2015). siRNAs и miRNAs во многом сходны по физико-химическим свойствам, обе являются короткими дуплексными молекулами РНК, которые подавляют активность генов-мишеней на посттранскрипционном уровне (Lam et al., 2015). Основное различие между siRNAs и miRNAs состоит в том, что первые обладают высокой специфичностью только к одной мРНК, тогда как вторые имеют несколько мишеней (Lam et al., 2015). Благодаря удобному использованию и специфичности при нокдауне генов, siRNAs постепенно заменили традиционные методы нокдауна генов, и, в настоящее время, они применяются для целенаправленного подавления конкретных генов (Chen et al., 2013). miRNAs подавляют экспрессию ряда генов-мишеней, которые часто работают вместе как сеть в рамках одного и того же сигнального пути или клеточного процесса (Lam et al., 2015; Shahriari et al., 2020). Эта способность miRNAs позволяет их рассматривать не только в качестве терапевтических средств для ряда заболеваний, в том числе сложных мультигенных заболеваний, но и в качестве прогностических биомаркеров (Lam et al., 2015). Поскольку siRNAs и miRNAs могут подавлять экспрессию практически всех генов и их транскриптов мРНК, они имеют преимущества над препаратами на основе малых молекул, воздействующих только на определенные классы белков, и препаратов на основе белков, включая высокоспецифичные моноклональные антитела, мишени которых в основном ограничены рецепторами на поверхности клетки или циркулирующими белками (Lam et al., 2015).

#### siRNA В ПОДАВЛЕНИИ ПРОАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Учитывая удобное расположение для локальной доставки терапевтических агентов, РПЭ является многообещающим местом-мишенью для снижения экспрессии ангиогенных факторов и предотвращения хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при лечении ВМД и других неоваскулярных заболеваний глаз (Chen et al., 2013). В настоящее время идет поиск мишеней в клетках РПЭ человека с целью блокирования неоваскуляризации с помощью siRNAs для лечения указанных заболеваний. В ряде работ показано, что в ангиогенезе влажной формы ВМД и диабетической ретинопатии важную роль играет ядерный фактор транскрипции-каппа В (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) (Yang et al., 2015; Luo et al., 2018). NF-κB активируется в ответ на различные стимулы – воспалительные цитокины, клеточный стресс, а также факторы роста (см. рис. 1) (Yang et al., 2015), и не активируется при подавлении экспрессии морфологических и биохимических маркеров, например retinal

pigment epithelium-specific protein 65kDa (RPE65) (Cottet et al., 2005). Так, в работе Коттет и соавт. (Cottet et al., 2005), выполненной на клеточной линии РПЭ взрослого человека ARPE-19, не выявлено изменений в активности NF-κB при нокдауне RPE65 с помощью siRNA. В свою очередь NF-κB регулирует большое число генов, многие из которых являются критическими для выживания клеток. Кроме того, NF-κB регулирует экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины (например, интерлейкин 8 (англ. interleukin 8, IL-8), фактор некроза опухоли-α (англ. tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)), молекулы адгезии, ангиогенные факторы (например, фактора роста эндотелия сосудов (англ. vascular endothelial growth factor, VEGF)) и ферменты деградации внеклеточного матрикса (например, металлопротеиназа-9 (англ. matrix metalloproteinase 9, MMP-9)), активность которых связана с миграцией клеток. Так, в работе Луо и соавт. (Luo et al., 2018) показано, что ингибирование каскада передачи сигналов внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (англ. extracellular signal-regulated kinases (ERK))/p38/NF-κB с помощью кинсенозида (англ. kinsenoside), активного лекарственного компонента, полученного из травы традиционной китайской медицины *Anoectochilus roxburghii*, способствовало снижению экспрессии VEGF в клетках ARPE-19, обработанных перекисью водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Другой подход для подавления функции NF-κB в клетках линии РПЭ человека D407 был использован Янг и соавт. (Yang et al., 2015). Исследователи использовали siRNA для нокдауна ключевой активной субъединицы p65 в транскрипции NF-κB (Yang et al., 2015). Однако большинство работ по использованию siRNAs для лечения влажной формы ВМД направлены на подавление в клетках РПЭ непосредственно экспрессии VEGF, ответственного за проницаемость и рост новых сосудов хориоидеи по направлению к сетчатке и ключевого компонента патогенеза CNV, предшественника ВМД (Garba, Mousa, 2010). В качестве лекарственных препаратов-кандидатов siRNA для лечения влажной формы ВМД были предложены бевазирианиб (англ. bevasiranib, ранее известный как Cand5) и AGN211745 (альтернативные названия: Sirna-027, AGN-745) (Lam et al., 2015; Saw, Song, 2020), нацеленные соответственно на VEGF (Garba, Mousa, 2010) и его рецептор 1 (VEGFR-1) (Kaiser et al., 2010). VEGFR-1 обнаруживается в основном на эндотелиальных клетках сосудов и стимулируется как VEGF, так и фактором роста плаценты (англ. placental growth factor, PlGF), что приводит к росту новых кровеносных сосудов. Однако разработка этих препаратов была прекращена. Клинические испытания бевазирианиба были остановлены на III фазе (ClinicalTrials.gov NCT00557791), а AGN-745 – на II фазе (ClinicalTrials.gov NCT00395057) в связи с

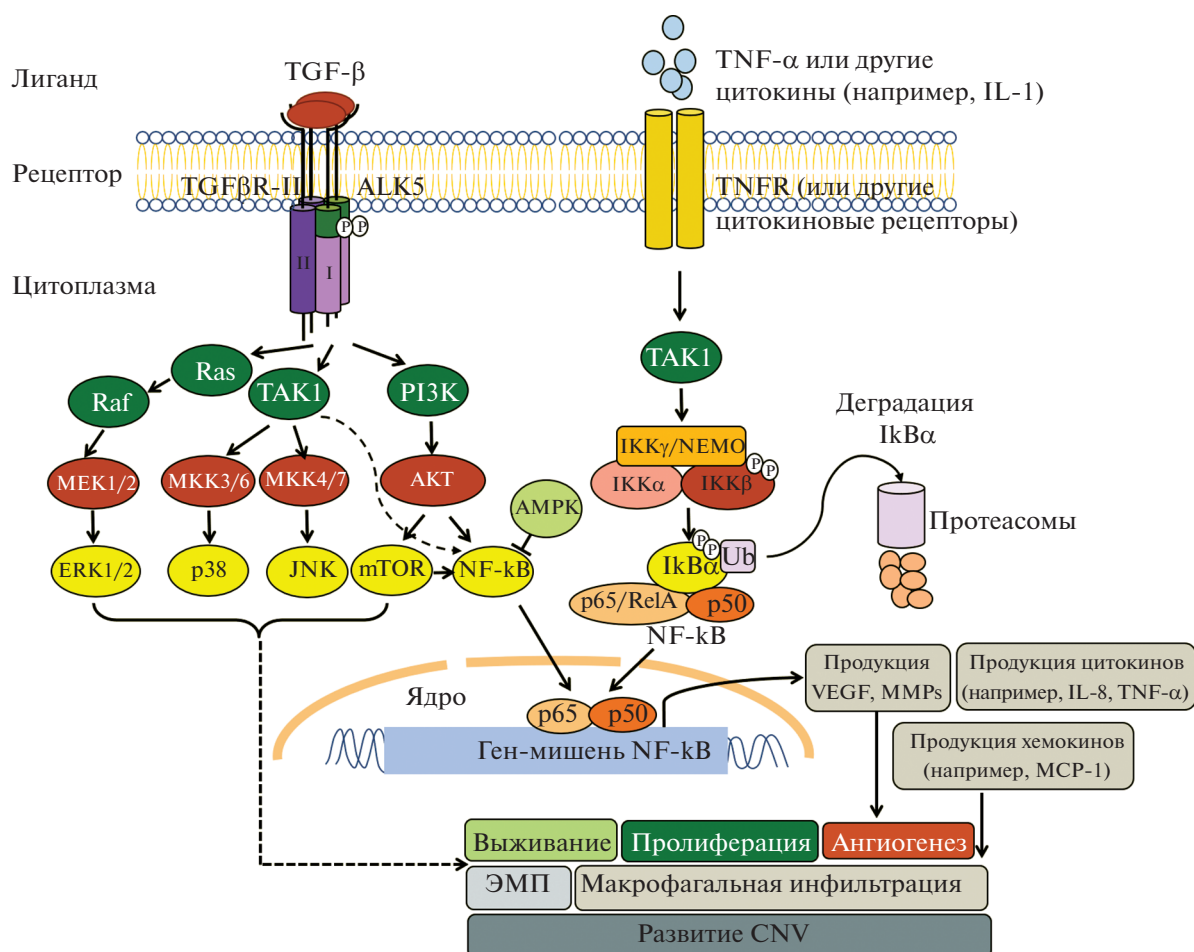
неэффективностью препаратов, они не улучшали остроту зрения. Еще одним препаратом-кандидатом для лечения влажной формы ВМД предложен PF-04523655 (другое название: PF-655). PF-655 представляет собой стабилизированную синтетическую химически модифицированную siRNA. Препарат подавляет экспрессию связанного со стрессом белка RTP801 (также известный как REDD1 и кодируемый *DDIT4*), запускаемую неблагоприятными условиями микроокружения (окислительным стрессом). RTP801 ингибирует мишень рапамицина у млекопитающих (англ. mammalian target of rapamycin, mTOR) и АКТ (англ. RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha) путем стабилизации ингибиторного комплекса (англ. tuberous sclerosis complex, TSC1/TSC2) и усиливает гибель клеток (Shoshani et al., 2002; Yoshida et al., 2010; Canal et al., 2014). Препарат прошел II фазу клинических испытаний (ClinicalTrials.gov NCT00713518), в котором показал увеличение средней остроты зрения в течение первых 3 мес. Однако о дальнейшей судьбе препарата пока не известно.

Исследования вклада siRNAs в подавлении активности генов продолжаются и результаты подтверждают потенциальную ценность этого класса некодирующей РНК в качестве нового терапевтического агента. Однако применение siRNAs также, как и miRNAs, в настоящее время еще имеет существенные ограничения. Они связаны не только с разработкой самого препарата: плохая стабильность *in vivo* (деградация эндогенными нуклеазами), проблемы с доставкой, эффекты нецелевого действия, в том числе нежелательный иммунный ответ, высокая стоимость производства, но и с выявлением продолжительности эффекта подавления активности генов (Lam et al., 2015). Кроме того, ограничения использования siRNAs связаны с выявлением конкретных генов, которые непосредственно вовлечены в патологический процесс. Так, общепризнано, что VEGF участвует в развитии и прогрессировании ВМД. Ряд авторов считает, что увеличение концентрации VEGF оказывает прямое неблагоприятное влияние на РПЭ и фоторецепторы (Terasaki et al., 2013; Ablonczy et al., 2014). Однако в других работах показана критическая роль VEGF не только в поддержании выживания и функционировании нейрональных клеток сетчатки (Nishijima et al., 2007; Saint-Geniez et al., 2008), но и в выживании и поддержании целостности РПЭ (Ford et al., 2011). Так, нейтрализация VEGF *in vitro* приводила к увеличению апоптоза и уменьшению плотности и длины микроворсинок клеток ARPE-19, а системная нейтрализация VEGF у мышей – к преходящим дегенеративным изменениям: вакуолизации РПЭ, отделению клеток от наружных сегментов фоторецепторов и уменьшению хориокапиллярных фенестраций (Ford et al., 2011). В экспери-

ментах по подавлению экспрессии VEGF с помощью siRNA в клеточной линии Мюллеровой глии приводило к значительной гибели клеток, тогда как добавление экзогенного VEGF к свежесыведленным фоторецепторным клеткам и эксплантам внешнего ядерного слоя способствовало их выживанию (Saint-Geniez et al., 2008). Эти результаты указывают на важную роль эндогенного VEGF в поддержании и функционировании нейрональных клеток сетчатки и РПЭ взрослого человека и указывают на то, что терапию против VEGF следует применять с осторожностью. В дополнении к этому, результаты говорят о необходимости более тщательного изучения вклада VEGF в патогенез ВМД.

### РОЛЬ miRNA В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА КЛЕТКИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

В настоящее время данные об экспрессии miRNA в сетчатке получены в основном из анализа мышинового miRNA transcriptome (miRNome), следовательно при переносе полученных данных на человека нужно учитывать структурные и функциональные различия между сетчаткой человека и мыши (Sundermeier, Palczewski, 2016; Donato et al., 2018). В геноме человека закодировано несколько тысяч miRNAs, образующих обширную регуляторную сеть, которая задействована в самых разных сигнальных путях и клеточных процессах (Shahriari et al., 2020). Кроме того, miRNAs существуют в экзосомах, и экзосомальные miRNAs могут доставляться в клетки-реципиенты в качестве сигнальных молекул (Zhang et al., 2019). Учитывая плейотропную природу регуляторных функций miRNA, в которых одна miRNA может нацеливаться на десятки или сотни транскриптов, регуляция miRNAs или miRNA-процессорных ферментов во время развития и заболеваний может привести к различным клеточным фенотипам (Shahriari et al., 2020). Так, в ряде работ на клетках РПЭ, полученных из эмбриональных стволовых клеток (ESCs) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) человека, показано, что уровень экспрессии определенных miRNAs можно использовать в качестве индикатора для созревания РПЭ (Hu et al., 2012; Shahriari et al., 2020). Поскольку miRNAs динамически регулируются во время дифференцировки ESCs или iPSCs в РПЭ, степень дифференцировки РПЭ может быть измерена путем профилирования специфических паттернов экспрессии miRNAs (Hu et al., 2012; Shahriari et al., 2020). В этих работах показано, что в процессе дифференцировки клеток РПЭ из ESCs человека miRNAs, связанные с плюрипотентностью, такие как miR-302–367 кластер



**Рис. 1.** Схематическое изображение перекрестной передачи сигналов между активированными каноническим NF-κB и неканоническими TGF-β путями во время развития хориоидальной неоваскуляризации (CNV) при возрастной макулярной дегенерации (ВМД). В отсутствие сигнала димеры NF-κB (например, p65/RelA–p50), связанные IκBα (ингибитор NF-κB alpha, англ. NF-κB inhibitor, alpha), располагаются в цитоплазме клеток РПЭ. При воздействии различных сигнальных молекул (например, TNF-α, TGF-β) происходит активация члена семейства MAPK киназ-киназ – TGF-β-активированной киназы 1 (TAK1, англ. TGF-β-activated kinase 1, другие названия: MAPK kinase-kinase 7, MAP3K7), что приводит к активации киназного комплекса IKK (киназа IκB, англ. IκB kinase). Комплекс IKK, состоящий из двух каталитических субъединиц (IKKα, IKKβ) и одной регуляторной (IKKγ/NEMO), фосфорилирует IκBα по двум N-концевым остаткам серина, после чего они подвергаются убиквитинированию и протеосомальной деградации. Димеры NF-κB высвобождаются и перемещаются в ядро клетки, где они регулируют транскрипцию генов-мишеней. ALK5 – активин рецептор-подобная киназа 5 (англ. activin receptor-like kinase 5, другое название – TGF-β-рецептор I типа, англ. TGFβRI – TGF-β-рецептор I); AMPK – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа (англ. AMP activated protein kinase) – клеточная протеинкиназа, контролирующая энергетический баланс клетки; JNK – c-Jun N-терминальная киназа (англ. c-Jun N-terminal kinase, другое название – связанная со стрессом протеинкиназа, англ. SAPK – stress-activated protein kinase); MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (англ. monocyte chemoattractant protein-1, другое название – CCL2, C-C motif ligand 2); MEK или MKK – другие названия MAPK kinase; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ. phosphoinositide 3-kinases); NEMO – основной модулятор NF-κB (англ. NF-κB essential modulator). P указывает на фосфорилирование, Ub – убиквитинирование. См. текст для других сокращений.

и семейство miR-370 регулируются отрицательно. В процессе дифференцировки (на 18-й день культивирования) наблюдается активация нейрональных miRNAs, например, miR-124-5p и miR-9-5p, с последующей понижающей их регуляцией на 60-й день (Shahriari et al., 2020), что может отражать нейральное происхождение клеток РПЭ. Однако отнесение miR-124-5p к нейрональным miRNAs не согласуется с данными другой работы,

в которой показано участие miR-124 в поддержании клетками РПЭ эпителиального фенотипа (Jun, Joо, 2016).

В дифференцирующихся и терминально дифференцированных клетках РПЭ более половины miRNome РПЭ составляют miR-204, miR-211, miR-125b и семейство let-7 (Shahriari et al., 2020). Так, показано участие miR-125b-5p и let-7a-5p в передаче сигналов митоген-активируемой проте-

инкиназы (англ. mitogen-activated protein kinase, MAPK) (Shahriari et al., 2020), избыточная активность которого приводит к ВМД, тогда как полное ингибирование пути MAPK вызывает гибель клеток сетчатки (Van Dijk et al., 2016). Эти наблюдения подчеркивают необходимость строгой регуляции MAPK и связанных путей в дифференцировке и поддержании клеток РПЭ.

MiR-204 и miR-211 имеют одну и ту же последовательность затравочной области и отличаются только двумя нуклеотидами в 3'-конце, они были классифицированы как одно семейство с одним и тем же набором прогнозируемых мишеней (TargetScan) (Lewis et al., 2005). Как показано в работе Аджанто и соавт. (Adijanto et al., 2012), miR-204/211 регулируют microphthalmia-associated transcription factor (MITF) и способствуют поддержанию эпителиального фенотипа в клетках РПЭ (см. табл. 1). Так, подавление экспрессии MITF приводило к потере фенотипа первичными фетальными клетками РПЭ человека, что предотвращалось сверхэкспрессией miR-204/211 (Adijanto et al., 2012). А Ванг и соавт. (Wang et al., 2010) показали, что прямыми мишенями miR-204 являются рецептор 2 трансформирующего фактора роста-бета (англ. transforming growth factor receptor type-2, TGF $\beta$ -II) и SNAI2 (SLUG). Снижение экспрессии miR-204 приводило к снижению экспрессии клаудинов 10, 16 и 19 в первичных фетальных клетках РПЭ человека, а использование анти-miR-204/211 – к снижению трансэпителиального сопротивления и проводимости апикальной мембраны. Последнее авторы объясняют тем, что мишенью miR-204 является белок калиевых каналов внутреннего выпрямления (англ. inward rectifying K<sup>+</sup>-channels, Kir) – Kir7.1, располагающийся на апикальной мембране клеток РПЭ (Wang et al., 2010). Как показали исследователи, анти-miR-204 снижает экспрессию Kir7.1 опосредовано, через активацию TGF $\beta$ -RII и передачу сигнала протеинкиназы C. Таким образом, miR-204 связывает TGF $\beta$ -RII и поддерживает гомеостаз калия. В целом, работы Ванга и соавт. (Wang et al., 2010), Аджанто и соавт. (Adijanto et al., 2012) и Ху и соавт. (Hu et al., 2012) указывают на критическую роль miR-204/211 в поддержании функции эпителиального барьера и физиологии клеток РПЭ. Как показано в этих работах, мишенями РПЭ-специфичных miRNAs являются как транскрипционные факторы, участвующие в дифференцировке РПЭ (Adijanto et al., 2012; Hu et al., 2012), так и рецепторы и регуляторные молекулы, расположенные ниже по течению TGF- $\beta$  сигнального пути, основного игрока ЭМП (Wang et al., 2010). В связи с этим предполагается, что терапевтические препараты на основе miR-204/211 могут быть эффективными средствами лечения заболеваний, которые включают дедифференцировку РПЭ, например, таких как ПВР.

Как показано, Чен и соавт. (Chen et al., 2014), при TGF- $\beta$ 2-индуцированном ЭМП в клетках РПЭ человека по-разному экспрессируется 304 miRNAs. Из этих дифференциально экспрессируемых miRNA, 185 miRNA были подавлены, а 119 miRNA были активированы по крайней мере в 2 раза в образцах, обработанных TGF- $\beta$ 2. Это важный шаг в идентификации miRNAs, связанных с прогрессированием ПВР и диабетической ретинопатии, и в идентификации потенциальных терапевтических мишеней для этих заболеваний. Результаты получили подтверждение в последующих работах (Jun, Joo, 2016; Li et al., 2016b; Deji et al., 2020). Так, в работе Дежи и соавт. (Deji et al., 2020) показано, что в обработанных TGF- $\beta$ 2 клетках ARPE-19 резко снижается экспрессия упомянутой выше miR-let7c и при этом активируется путь передачи сигнала NF- $\kappa$ B. Помимо miR-204/211 и семейства let7 ряд других miRNA, такие как miR-21 (Usui-Ouchi et al., 2016), miR-29b (Li et al., 2016b), miR-124 (Jun, Joo, 2016), miR-182 (Wang et al., 2016) и miR-194 (Cui et al., 2019), были признаны молекулярными регуляторами и потенциальными терапевтическими мишенями при ПВР. Например, Ли и соавт. (Li et al., 2016b) показали, что ингибирование miR-29b в клетках ARPE-19 напрямую запускало процесс ЭМП, который характеризовался фенотипическими изменениями, активацией альфа-гладкомышечного актина ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ SMA), подавлением E-кадгерина и zonula occludens 1 (ZO-1) и повышенной миграцией клеток. Кроме того, авторы показали, что мишенью miR-29b был AKT2, участник неканонического TGF- $\beta$  сигнального пути, подавление которого ингибировало TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП. В работе Куи и соавт. (Cui et al., 2019) сверхэкспрессия miR-194 значительно ингибировала TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП клеток ARPE-19, при этом значительно снижалась экспрессия некоторых генов, которые регулируются zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1). Джун и Жу (Jun, Joo, 2016) на клетках ARPE-19 показали снижение уровня экспрессии miR-124 при прогрессировании ЭМП. Ингибирование эндогенного miR-124 способствовало увеличению мезенхимальных и снижению эпителиальных маркеров. Сверхэкспрессия miR-124 увеличивала уровни ZO-1 и окклюдина, подавляла уровни фибронектина,  $\alpha$ SMA и виментина, а также подавляла TGF- $\beta$ 1-индуцированное сокращение коллагенового геля клетками РПЭ. Кроме того, как выявлено в исследовании, мишенью miR-124 была мРНК Ras homology Growth-related (RHOG).

MiR-34a, как показали Хоу и соавт. (Hou et al., 2013), была подавлена в субконфлюэнтных по сравнению с постконфлюэнтными клетками ARPE-19. Авторы предполагают, что miR-34a ингибирует пролиферацию и миграцию клеток, поскольку она подавляла рецептор фактора роста гепатоци-

**Таблица 1.** Проявления в клетках РПЭ при регуляции экспрессии miRNA

miRNA	Мишень miRNA	Проявления в клетках РПЭ	Источник
Подавление экспрессии miRNA			
miR-204	TGFβ-RII, SNAI2 (SLUG), Kir7.1	Снижение экспрессии клаудинов 10, 16 и 19	(Wang et al., 2010)
miR-204/211	НД	Снижение экспрессии MITF	(Adijanto et al., 2012)
miR-let7c	НД	Активация NF-κB сигнального пути	(Deji et al., 2020)
miR-29b	АКТ2	ЭМП: активация αSMA, подавление E-кадгерина и ZO-1, повышение миграционной активности клеток ARPE-19	(Li et al., 2016b)
miR-124	RHO G	ЭМП: увеличение мезенхимальных и снижение эпителиальных маркеров в клетках ARPE-19	(Jun, Joo, 2016)
miR-34a	c-Met, CDK2, CDK4, CDK6, E2F1, p-Cdc2	Пролиферация и миграция клеток ARPE-19	(Hou et al., 2013)
miR-182	c-Met	Пролиферация и миграция первичных клеток РПЭ	(Wang et al., 2016)
miR-21	НД	Подавление пролиферации и миграции клеток ARPE-19	(Usui-Ouchi et al., 2016)
miR-184	EZR	Снижение уровня белка LAMP-1 в первичной культуре РПЭ человека (у пациентов с ВМД)	(Murad et al., 2014)
miR-23a	Fas	Увеличение апоптоза клеток ARPE-19	(Lin et al., 2011)
miR-23a	GLS1	Восстановление метаболизма глутамина, увеличение выживаемости клеток ARPE-19	(Li et al., 2016a)
Увеличение экспрессии miRNA			
miR-124	RHO G	Увеличение уровня ZO-1 и окклюдина, подавление уровней фибронектина, αSMA и виментина, подавление TGF-β1-индуцированного сокращения коллагенового геля клетками ARPE-19	(Jun, Joo, 2016)
miR-194	НД	Ингибирование TGF-β1-индуцированного ЭМП клеток ARPE-19, снижение экспрессии генов, регулируемых ZEB1	(Cui et al., 2019)
miR-93	TGFβR-II	Снижение секреции VEGF-A, ингибирование	(Fuchs et al., 2020)
miR-302d	TGFβR-II, Smad2 и Smad3	TGF-β-индуцированного ЭМП клеток ARPE-19	

НД – нет данных.

тов (англ. hepatocyte growth factor receptor) c-Met и другие молекулы, связанные с клеточным циклом, такие как циклин-зависимые киназы 2, 4 и 6 (англ. cyclin-dependent kinases 2, 4, 6; CDK2, CDK4, CDK6), фактор транскрипции E2F1 и фосфорилированный белок контроля клеточного деления (англ. phospho-cell division control protein, p-Cdc2). В подавлении c-Met участвует и еще одна miRNA – miR-182 (Wang et al., 2016). Так, показано, что трансфекция miR-182 в первичные клетки РПЭ индуцировала подавление c-Met и снижение образования p-AKT. Подавление c-Met в свою очередь приводило к снижению пролиферации и миграции клеток РПЭ. Исследователи полагают, что подавление miR-182 вместе с активацией c-Met в эпиретинальных мембранах играют

важную роль в развитии ПВР. В связи с чем, стратегия селективной активации экспрессии miR-182 в клинических условиях может представить новый вариант лечения этого заболевания.

Эксперименты Усуи-Оучи и соавт. (Usui-Ouchi et al., 2016) по усилению и потере функции, связанной с ангиогенезом и развитием фиброза, показали, что miR-21, в отличие от miR-34a и miR-182, наоборот способствует пролиферации и миграции клеток ARPE-19. При этом miR-21 не влияет на экспрессию генов, связанных с ЭМП. Моррис и соавт. (Morris et al., 2020), используя совместное культивирование первичных фетальных клеток РПЭ человека и микроглии сетчатки мыши, показали, что miR-21 переносится между двумя типами клеток. Кроме того, авторы показали, что

уровень внутриклеточного miR-21 был повышен в старом РПЭ, и это могло способствовать его увеличению в экзосомах и соответственно в микроглии. Повышенный уровень miR-21 в микроглии влиял на экспрессию генов ниже по ходу пути р53. Эти данные, по мнению авторов, предполагают, что опосредованный экзосомами перенос miRNA является сигнальным механизмом, который вносит вклад в регуляцию функции микроглии в стареющей сетчатке. Полученные данные согласуются с результатами работы Шахриари и соавт. (Shahriari et al., 2020), показавшими, что экспрессия hsa-miR-21-5p в течение дифференцировки РПЭ из ESCs значительно не меняется.

### РОЛЬ miRNA В ПАТОГЕНЕЗЕ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕТЧАТКИ

В ряде исследований показано, что miRNAs могут играть важную роль в патогенезе ВМД и пигментном ретините (Lin et al., 2011; Li et al., 2016a; Donato et al., 2018). Поскольку основным индуктором гибели и старения клеток РПЭ при ВМД и пигментном ретините считается окислительный стресс, большое количество работ посвящено выявлению изменений экспрессии miRNAs под влиянием окислителей. Так, Донато и соавт. (Donato et al., 2018) с помощью транскриптомного анализа первичных клеток РПЭ человека, обработанных окислителем, окисленного липопротеина низкой плотности, выявили изменения в экспрессии 23 miRNAs по сравнению с контролем. Изменения касались в том числе таких miRNAs, как hsa-miR-1307, hsa-miR-3064, hsa-miR-4709, hsa-miR-3615 и hsa-miR-637, нацеленных на гены (*KLHL7*, *RDH11*, *CERKL*, *AIP1*, *USH1G*), участвующие в различных биохимических процессах. Так, выявлено, что мишенью для hsa-miR-1307 является мРНК гена *KLHL7*, мутации которого могут определять изменения в убиквитинировании белков-мишеней для протеасом-опосредованной деградации; мишенью hsa-miR-3064 — *RDH11*, кодирующий фермент, необходимый для зрительного и системного метаболизма ретиноевой кислоты; мишенью hsa-miR-4709 — *CERKL*, кодирующий антиоксидантный белок, имеющий решающее значение для выживания фоторецепторов; мишенью hsa-miR-3615 — *AIP1*, мутации которого вызывают различные формы рецессивной ретинопатии и врожденного амавроза Лебера; а мишенью hsa-miR-637 — *USH1G*, один из наиболее известных причинных генов синдрома Ашера I типа (Donato et al., 2018).

Мурад и соавт. (Murad et al., 2014) с помощью протеомного анализа показали, что ген эзрина (*EZR*) является мишенью для miR-184 в РПЭ человека. В первичной культуре РПЭ человека, выделенного из глаз доноров с ВМД (РПЭ ВМД),

miR-184 была значительно подавлена по сравнению с контрольным (нормальным) РПЭ. Подавление miR-184 соответствовало значительно более низким уровням лизосомально-ассоциированного мембранного белка 1 (англ. lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1), необходимого для образования фагоцитарных вакуолей. Сверхэкспрессия miR-184 в РПЭ ВМД способствовала восстановлению экспрессии белка LAMP-1 до нормальных уровней. В целом, эти наблюдения свидетельствуют о важной роли miR-184 в жизнедеятельности РПЭ и поддерживают гипотезу, предполагающую, что подавление экспрессии miR-184 во время старения может приводить к нарушению регуляции функции РПЭ, способствуя дегенерации сетчатки (Murad et al., 2014).

В ряде случаев определение роли той или иной miRNA противоречивы. Так, Лин и соавт. (Lin et al., 2011) с помощью количественной ПЦР в реальном времени обнаружили подавление экспрессии miR-23a в клетках РПЭ из области макулы пациентов с ВМД. Кроме того, авторы показали, что miR-23a подавлялась в первичных клетках РПЭ и клетках линии ARPE-19 при более высокой дозе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Используя ингибитор miR-23a, авторы выявили увеличение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной смерти и апоптоза клеток ARPE-19, тогда как активация miR-23a защищала клетки ARPE-19 от окислительного повреждения (Lin et al., 2011). В то же время в другой работе показан противоположный эффект. Так, обработка клеток ARPE-19 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активировала miR-23a (Li et al., 2016a). В связи с этим авторы предположили, что ингибирование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной miR-23a будет защищать клетки РПЭ от гибели, вызванной окислительным стрессом. В то же время, как показано в работе Ху и соавт. (Hu et al., 2012), во время развития РПЭ из ESCs экспрессия miR-23a значительно увеличивается, свидетельствуя об участии miR-23a в поддержании здорового РПЭ. В качестве механизма, задействованного в защите клеток РПЭ от окислительного повреждения, Лин и соавт. (Lin et al., 2011) предположили участие miR-23a в регуляции апоптотического фактора Fas. Тогда как Ли и соавт. (Li et al., 2016a) показали, что прямой мишенью miR-23a в клетках РПЭ является глутаминаза 1 (англ. glutaminase 1, GLS1), которую подавляет H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GLS1 — митохондриальный фермент, который гидролизует глутамин в глутамат и способствует пролиферации клеток. По мнению Ли и соавт. (Li et al., 2016a), ингибирование miR-23a будет способствовать восстановлению метаболизма глутамин, поэтому miR-23a может быть новой терапевтической мишенью при дегенеративных заболеваниях сетчатки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обширные функции малых некодирующих РНК и возможность их локальной доставки в глаз требует пристального изучения, так как они могут быть полезны в качестве новых классов терапевтических агентов для лечения широкого спектра офтальмологических заболеваний. Однако, нужно отдавать себе отчет в том, что имеющиеся в настоящее время различия в результатах исследований нуждаются в уточнении и снятии противоречий. Тем не менее, очевидно, что дальнейшие исследования по дифференциально экспрессируемым miRNAs в сетчатке и РПЭ необходимо продолжить, поскольку это поможет как в идентификации биомаркеров пролиферативных и дегенеративных заболеваний сетчатки, так и в установлении потенциальных мишеней для терапии препаратами на основе miRNAs.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарность коллегам за помощь в подготовке статьи.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках раздела Госзадания ИБР РАН на 2021 год № 0088-2021-0017.

## 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 А.В. Кузнецова проводила анализ мировой литературы, участвовала в написании основного текста статьи и подготовке иллюстративного материала. Авторы Л.А. Ржанова и М.А. Александрова участвовали в редактировании и обсуждении текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ablonczy Z., Dahrouj M., Marneros A.G.* Progressive dysfunction of the retinal pigment epithelium and retina due to increased VEGF-A levels // *FASEB J.* 2014. V. 28. № 5. P. 2369–2379.
- Adijanto J., Castorino J.J., Wang Z.X. et al.* Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 24. P. 20491–20503.
- Ahmadzada T., Reid G., McKenzie D.R.* Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer // *Bio-phys. Rev.* 2018. V. 10. № 1. P. 69–86.
- Askou A.L., Aagaard L., Kostic C., et al.* Multigenic lentiviral vectors for combined and tissue-specific expression of miRNA- and protein-based antiangiogenic factors // *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.* 2015. V. 2. P. 14064.
- Cabral T., Mello L.G.M., Lima L.H. et al.* Retinal and choro-roidal angiogenesis: a review of new targets // *Int. J. Retin. Vitr.* 2017. V. 3. № 1.
- Canal M., Romani-Aumedes J., Martín-Flores N. et al.* RTP801/REDD1: A stress coping regulator that turns into a troublemaker in neurodegenerative disorders // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. V. 8. № OCT.
- Chen C.W., Yeh M.K., Shiau C.Y. et al.* Efficient downregulation of VEGF in Retinal pigment epithelial cells by integrin ligand-labeled liposome-mediated siRNA delivery // *Int. J. Nanomedicine.* 2013. V. 8. P. 2613–2627.
- Chen X., Ye S., Xiao W. et al.* Differentially expressed microRNAs in TGFβ2-induced epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelium cells // *Int. J. Mol. Med.* 2014. V. 33. № 5. P. 1195–1200.
- Cottet S., Favez T., Maurer F. et al.* Targeted silencing of RPE65 in the retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 using lentivirus-mediated siRNA delivery // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. V. 46. № 13. P. 3054.
- Cui L., Lyu Y., Jin X. et al.* miR-194 suppresses epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by directly targeting ZEB1 // *Ann. Transl. Med.* 2019. V. 7. № 23. P. 751.  
<https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.90>
- Deji Q.Z., Yan F., Zhaba W.D. et al.* Cross-talk between microRNA-let7c and transforming growth factor-β2 during epithelial-to-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Ophthalmol.* 2020. V. 13. № 5. P. 693–700.
- Dijk E.H.C. Van, Duits D.E.M., Versluis M., et al.* Loss of MAPK pathway activation in post-mitotic retinal cells as mechanism in mek inhibition-related retinopathy in cancer patients // *Med. (United States).* 2016. V. 95. № 18. P. e3457.
- Donato L., Bramanti P., Scimone C. et al.* miRNA expression profile of retinal pigment epithelial cells under oxidative stress conditions // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8. № 2. P. 219–233.
- Ford K.M., Saint-Geniez M., Walshe T. et al.* Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. № 13. P. 9478–9487.
- Fuchs H.R., Meister R., Lotke R., Framme C.* The microRNAs miR-302d and miR-93 inhibit TGFβ-mediated EMT and VEGFA secretion from ARPE-19 cells // *Exp. Eye Res.* 2020. V. 201.
- Garba A.O., Mousa S.A.* Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration // *Ophthalmol. Eye Dis.* 2010. V. 2. P. OED.S4878.
- Hou Q., Tang J., Wang Z. et al.* Inhibitory effect of microRNA-34a on retinal pigment epithelial cell proliferation and migration // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. V. 54. № 10. P. 6481–6488.



- Hu G., Huang K., Yu J. et al. Identification of miRNA signatures during the differentiation of hESCs into retinal pigment epithelial cells // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. P. e37224.
- Jun J.H., Joo C.K. MicroRNA-124 controls transforming growth factor  $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelium by targeting RHO G // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. № 1. P. 12–20.
- Kaiser P.K., Symons R.C.A., Shah S.M. et al. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027 // Am. J. Ophthalmol. 2010. V. 150. № 1.
- Kaneko H., Terasaki H. Biological involvement of microRNAs in proliferative vitreoretinopathy // Transl. Vis. Sci. Technol. 2017. V. 6. № 4.
- Lam J.K.W., Chow M.Y.T., Zhang Y., Leung S.W.S. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing // Mol. Ther. – Nucleic Acids. 2015. V. 4. № 9. P. e252.
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // Cell. 2005. V. 120. № 1. P. 15–20.
- Li D. dan, Zhong B. wu, Zhang H. xia, et al. Inhibition of the oxidative stress-induced miR-23a protects the human retinal pigment epithelium (RPE) cells from apoptosis through the upregulation of glutaminase and glutamine uptake // Mol. Biol. Rep. 2016a. V. 43. № 10. P. 1079–1087.
- Li M., Li H., Liu X. et al. MicroRNA-29b regulates TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2 // Exp. Cell Res. 2016b. V. 345. № 2. P. 115–124.
- Lin H., Qian J., Castillo A.C. et al. Effect of miR-23 on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. V. 52. № 9. P. 6308–6314.
- Luo X., Gu S., Zhang Y., Zhang J. Kinsenoside ameliorates oxidative stress-induced RPE cell apoptosis and inhibits angiogenesis via Erk/p38/NF- $\kappa$ B/VEGF signaling // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. № 240.
- Morris D.R., Bounds S.E., Liu H. et al. Exosomal miRNA transfer between retinal microglia and RPE // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 10.
- Murad N., Kokkinaki M., Gunawardena N. et al. MiR-184 regulates ezrin, LAMP-1 expression, affects phagocytosis in human retinal pigment epithelium and is downregulated in age-related macular degeneration // FEBS J. 2014. V. 281. № 23. P. 5251–5264.
- Nishijima K., Ng Y.S., Zhong L. et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury // Am. J. Pathol. 2007. V. 171. № 1. P. 53–67.
- Saint-Geniez M., Maharaj A.S.R., Walshe T.E. et al. Endogenous VEGF is required for visual function: Evidence for a survival role on Müller cells and photoreceptors // PLoS One. 2008. V. 3. № 11.
- Saw P.E., Song E.W. siRNA therapeutics: a clinical reality // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. № 4. P. 485–500.
- Shahriari F., Satarian L., Moradi S. et al. MicroRNA profiling reveals important functions of miR-125b and let-7a during human retinal pigment epithelial cell differentiation // Exp. Eye Res. 2020. V. 190. P. 107883.
- Shoshani T., Faerman A., Mett I. et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22. № 7. P. 2283–2293.
- Sundermeier T.R., Palczewski K. The impact of microRNA gene regulation on the survival and function of mature cell types in the eye // FASEB J. 2016. V. 30. № 1. P. 23–33.
- Terasaki H., Kase S., Shirasawa M. et al. TNF- $\alpha$  decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- $\kappa$ B pathways // PLoS One. 2013. V. 8. № 7.
- Usui-Ouchi A., Ouchi Y., Kiyokawa M. et al. Upregulation of mir-21 levels in the vitreous humor is associated with development of proliferative vitreoretinal disease // PLoS One. 2016. V. 11. № 6.
- Wang F.E., Zhang C., Maminishkis A. et al. MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology // FASEB J. 2010. V. 24. № 5. P. 1552–1571.
- Wang L., Dong F., Reinach P.S., et al. MicroRNA-182 suppresses HGF/SF-induced increases in retinal pigment epithelial cell proliferation and migration through targeting C-met // PLoS One. 2016. V. 11. № 12.
- Yang L., Liu Z., Gong H. et al. Efficient delivery of NF- $\kappa$ B siRNA to human retinal pigment epithelial cells with hyperbranched cationic polysaccharide derivative-based nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. 2015. V. 10. № 1. P. 2735.
- Yoshida T., Mett I., Bhunia A.K. et al. Rtp801, a suppressor of mTOR signaling, is an essential mediator of cigarette smoke-induced pulmonary injury and emphysema // Nat. Med. 2010. V. 16. № 7. P. 767–773.
- Zhang Y., Liu Y., Liu H., Tang W.H. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential // Cell Biosci. 2019. V. 9. № 1. P. 1–18.

## Small Non-Coding RNA in Regulation of Differentiation of Retinal Pigment Epithelium

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

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

\*e-mail: avkuzn@list.ru

Dedifferentiation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human retinal pigment epithelial (RPE) cells, as well as the participation of cells in neovascularization of the retina and choroid, underlie the devel-

opment of various ophthalmic diseases that lead to serious loss of vision. Understanding the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of RPE cell differentiation, as well as elucidating the role of RPE cells in eye angiogenesis, will help identify new therapeutic targets for the treatment of ophthalmopathy. The discovery that small non-coding RNAs – small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) – are involved in gene regulation has prompted research to investigate the role of siRNAs in inhibiting gene expression in RPE cells involved in ocular angiogenesis, as well as identifying the role of miRNAs in the regulation of differentiation and EMT of RPE cells. The ability to locally deliver small non-coding RNAs directly to the eye could be useful as new classes of therapeutic agents for the treatment of a wide range of ophthalmic diseases.

*Keywords:* retinal pigment epithelium, RPE, siRNA, miRNA, epithelial-mesenchymal transition, EMT, angiogenesis, VEGF, choroidal neovascularization, neovascular eye diseases, vitreoretinal diseases, age-related macular degeneration