

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Климович Полина Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В ПРОЦЕССАХ
РОСТА И РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВОВ**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научные руководители (консультант)**
- *Рубина Ксения Андреевна, доктор биологических наук, доцент*
 - *Семина Екатерина Владимировна, кандидат биологических наук*
- Официальные оппоненты**
- *Исаев Николай Константинович, доктор биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова*
 - Антипова Татьяна Алексеевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии» имени В.В.Закусова*
 - Дьяконова Варвара Евгеньевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии развития Института биологии развития им. Кольцова РАН*

Защита диссертации состоится «27» октября 2020 г. В 15.30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.09 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд.М-1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/262316516/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В биологической науке хорошо изучены фундаментальные основы отдельных молекулярных процессов, происходящих при регенерации нервов; однако, отсутствует интегральный взгляд на комплексные процессы восстановления периферических нервов. Существующие терапевтические подходы к регенерации нервов остаются малоэффективными, поэтому изучение молекулярных механизмов восстановления периферических нервов, остается актуальной задачей биологии и медицины. Периферическая нервная система (ПНС) обладает способностью к регенерации, которая зависит от скорости и направления роста аксонов, пролиферации Шванновских клеток (ШК), выживаемости нейронов, взаимодействия ШК и аксонов с внеклеточным матриксом (ВКМ), атрофии органов/тканей-мишеней (Namgung, 2014). Выживание нейронов, рост нейритов и их взаимодействие со ШК обеспечиваются нейротрофическими факторами, такими как NGF, GDNF и др. (Gordon, 2009). Адгезия регенерирующих нейритов и направление конуса роста обеспечивается интегринами и их лигандами (белками ВКМ), которые широко экспрессируются в ЦНС и ПНС (Lowery and Van Vactor, 2009). Большой вклад в процессы регенерации вносит урокиназная система, урокиназа uPA и ее рецептор uPAR, стимулирующие восстановление нервов за счет деградации фибрина и матриксных белков, ингибирующих рост нейритов. Также они способствуют высвобождению нейротрофинов и цитокинов из окружающего матрикса и их активации (Siconolfi and Seeds, 2001). Взаимодействуя с интегринами, uPA и uPAR модулируют внутриклеточную сигнализацию, регулируемую адгезию, миграцию, пролиферацию и выживаемость клеток (Degryse *et al*, 2008; Smith and Marshall, 2010). На направленный рост нейритов и миграцию глиальных клеток большое влияние оказывают хемокиновые рецепторы. Известно, что uPAR обладает хемотактическими свойствами и может стимулировать хемотаксис клеток (Blasi *et al*, 2002).

Таким образом, урокиназная система вовлечена в различные этапы восстановления периферических нервов. В то же время, известно, что uPAR способен модулировать функции множества белков, участвующих в регенерации. Изучение основных компонентов урокиназной системы и молекулярных механизмов ее функционирования в клетках нервной системы чрезвычайно важно для разработки новых подходов к терапии в регенеративной медицине.

Степень разработанности темы. Известно, что uPA и uPAR экспрессируются в эмбриогенезе при активации миграции клеток нервного гребня. Нокаут гена, кодирующего uPAR мыши, вызывает потерю ГАМК-ергических интернейронов в коре головного мозга и приводит к нарушению когнитивных функций. Во взрослом организме в норме uPA и uPAR экспрессируется в ЦНС и в нейронах и Шванновских клетках периферических нервов; экспрессия этих белков в нервах повышается в первые часы после травмы. Показано, что нокаут генов, кодирующих uPA и uPAR, у мышей нарушает функциональное восстановление ЦНС после ишемического инсульта и функциональное восстановление седалищного нерва после травмы. При изучении механизмов обнаружено нарушение протеолиза внеклеточного матрикса и повышенное отложение фибрина в периферических нервах. Несмотря на полученные данные об участии урокиназной системы в регенерации, на данный момент механизмы влияния uPAR/uPA на регенерацию нервов в ПНС остаются малоизученными.

Целью исследования является изучение механизмов регенерации периферических нервов с участием урокиназной системы.

Задачи исследования:

1. Проанализировать роль урокиназной системы в регенерации периферических нервов.
2. Охарактеризовать особенности функционирования рецептора урокиназы и его роль в регуляции направленного роста аксонов.
3. Выявить молекулярные и клеточные механизмы, опосредующие регенерацию периферических нервов, и возможную роль в ней взаимодействия урокиназной системы с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами.
4. Выявить белки-молекулярные партнеры урокиназного рецептора, опосредующих направленный рост и регенерацию аксонов.

Объектом исследования является малоберцовый нерв после травмы у мышей линии C57Bl, нокаутных по генам урокиназы и урокиназного рецептора, **предмет исследования** - урокиназная система и ее взаимодействие с латеральными партнерами.

Научная новизна работы. Впервые показано, что uPAR регулирует траекторию роста аксонов, а его растворимая форма стимулирует направленный рост нейритов, взаимодействуя с хемокиновым рецептором FPRL1. Впервые обнаружены функции uPAR в регенерации периферических нервов, не зависящие от uPA: у животных, нокаутных по гену uPAR, но не uPA,

замедляется функциональное и морфологическое восстановление нерва. Обнаружен новый механизм участия uPAR в регенерации нервов и нейритогенезе за счет регуляции экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов. Доказано, что для стимуляции нейритогенеза необходимо латеральное взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты расширяют понимание фундаментальных молекулярно-клеточных механизмов роста и регенерации нервов. Урокиназная система может стать мишенью для разработки лекарственных препаратов для стимуляции регенерации в периферической нервной системе. В работе разработаны новые модели для изучения регенерации и направленного роста нейритов *ex vivo*, которые могут быть использованы в исследовательских и практических целях.

Методология и методы диссертационного исследования. Анализ данных литературы, постановка цели и задач исследования. В ходе исследования применены биохимические, цитологические, гистологические, физиологические и статистические методы анализа полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Урокиназная система стимулирует рост аксонов и регулирует траекторию их роста только при экспрессии uPAR.
2. Нокаут урокиназного рецептора приводит к задержке в регенерации периферических нервов у мыши и нарушает нейритогенез в клетках Neuro2A.
3. При нокауте урокиназы повышается экспрессия урокиназного рецептора в периферических нервах у мыши.
4. При травме периферических нервов повышаются экспрессии урокиназного рецептора, $\alpha 5\beta 1$ -интегринов и их солокализация.
5. Взаимодействие uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов стимулирует нейритогенез.
6. Растворимая форма suPAR, взаимодействуя с рецептором FPRL1, является хемоаттрактаном для растущих нейритов.

Степень достоверности данных. Статистическую обработку результатов проводили в программах RStudio и SigmaPlot.

Апробация работы. Материалы настоящей работы были представлены на II, III и IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине в Москве (3–5 декабря 2015 г., 15-18 ноября 2017 г., 20-23 ноября 2019 г.), V, VI Съезде физиологов и Съезде биохимиков России в Сочи (4-8 октября 2016 г., 1-6 октября 2019), 4-ом германо-российском симпозиуме «Совместное заседание

Берлинско-Бранденбургской академии наук и гуманитарных наук и Российской академии наук» в Москве (6-7 апреля 2017), международной конференции Биохимия, молекулярная биология и аллергия (Biochemistry, Molecular Biology and Allergy) в Амстердаме (11-12 октября 2018). Апробация работы была проведена на заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины по адресу Ломоносовский проспект 27 к10, аудитория 319 в 10.00 24 января 2020 г., протокол №, 24/01.

Личный вклад автора заключается в анализе данных литературы, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных, подготовке публикаций. Основные результаты работы получены самим автором.

Публикации. Результаты данной работы представлены в виде 6 статей в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 131 странице и состоит из следующих разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Список литературы включает 168 источников. Диссертация содержит 36 рисунков и 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клеточные культуры. Использовали клеточные линии нейробластомы мыши Neuro 2A (N2A) и эмбриональных почек человека НЕК-293.

Плазмиды и миРНК. Для гиперэкспрессии uPAR использовали плазмиду pN1-uPAR, для подавления экспрессии - sh-uPAR (uPAR shRNA Plasmid, Santa Cruz). Для подавления экспрессии uPAR методом CRISPR/CAS9 использовали плазмиды pX458nickase-sg1 и pX458nickase-sg2.

Трансфекция клеток. Трансфекцию проводили согласно рекомендациям производителя используя Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Животные. Использовали мышей самцов дикого типа CBA/C57Bl6 (WT), нокаутных по гену PLAУ CBA/C57Bl6 (uPA^{-/-}), нокаутных по гену PLAUR C57Bl6/SV129 (uPAR^{-/-}) в возрасте 4-6 недель.

Модель повреждения периферического нерва. Общий малоберцовый нерв мыши (*n. Peroneus communis*) однократно раздавливали при помощи пинцета.

Электрофизиологическое исследование. Животных умерщвляли, изолировали нервы и стимулировали серебряными электродами в электрофизиологической камере с раствором Лайли на 7–8 мм проксимальнее места повреждения. Регистрировали суммарные потенциалы действия нерва (СПДН) и анализировали в программе PowerGraph Professional 3.3.

Получение криосрезов нервов. Изолированные нервы фиксировали 4% раствором формальдегида. Отмывали в PBS, замораживали в среде Tissue-Tek (Sakura Finetek). Далее получали криосрезы толщиной 6 мкм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Ткани или клетки промывали PBS, фиксировали в 4% растворе формальдегида. Для повышения проницаемости (пермеабиллизации) мембран использовали 0,1% раствор TritonX-100. Образцы обрабатывали раствором нормальной сыворотки осла или козы. Последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами во влажной камере при 4°C, промывали и наносили раствор DAPI (Invitrogen). Заключили в нефлюоресцирующую среду Aqua Poly Mount (Polysciences).

Конфокальная микроскопия. Препараты снимали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии Zeiss (LSM 780) и Leica (TCS SP5). DAPI, AlexaFluor®488 и AlexaFluor®594 возбуждали лазерами с длиной волны 405 и 488, 594. Интенсивность флуоресценции оценивали в программе ImageJ. Солокализацию оценивали в плагине Coloc2 для ImageJ, используя коэффициенты Мандерса M1 и M2. В настоящей работе коэффициент M1 означает долю сигнала флуоресценции uPAR, перекрывающегося с флуоресценцией сигнала интегринов, а M2 - долю сигнала флуоресценции интегринов, перекрывающихся с флуоресценцией сигнала uPAR.

Выделение спинальных ганглий (СГ) мыши. Мышей умерщвляли, фиксировали и дезинфицировали 70% раствором этанола. Выделяли СГ в асептических условиях, используя стереомикроскоп Olympus SZ Stereo, и помещали в боросиликатные камеры в каплю Матригеля. После полимеризации Матригеля добавляли полную среду DMEM. Образцы культивировали в стерильном влажном инкубаторе при 37°C и 5% концентрации CO₂.

Выделение первичной культуры нейронов из СГ мышцы. СГ мышцы помещали в 1 мг/мл раствор коллагеназы (Collagenase type I, 285 U/mg, Gibco), приготовленный на буфере Хэнкса. Инкубировали 90 минут при $t=37$ °С. Далее СГ гомогенизировали инсулиновым шприцем и центрифугировали 10 минут на скорости 2000 об/мин, удаляли раствор коллагеназы и добавляли 1 мл среды DMEM. Пипетировали и наносили на стекла, покрытые L-полилизинном.

Эксперимент по разобщению взаимодействия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов. Для разобщения uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов использовали блокирующий пептид $\alpha 325$ не влияющий на RGD-зависимую адгезию интегринов к матриксу. Синтез пептидов α -325 и s-325 (контрольный пептид) проводили с С-конца с применением Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил) методологии.

Статистический анализ проводили в программном обеспечении SigmaPlot11.0 и RStudio. Для межгрупповых сравнений использовали ANOVA с критерием Тьюки или ANOVA on Ranks. Т-тест или тест Манна-Уитни применялся для сравнения двух групп. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Реакция ко-иммунопреципитации. Клетки N2A культивировали в среде DMEM с добавлением пептидов $\alpha 325$ или s325 (100 нМ). Клетки лизировали и проводили ко-иммунопреципитацию с использованием набора Dynabeads™ Protein G (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Использовали антитела против $\alpha 5$ интегрин или IgG в качестве контроля. Иммунопреципитированные белки элюировали буфером SDS/PAGE и анализировали с помощью метода Вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг. Образцы разделяли в ПААГ геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны блокировали обезжиренным молоком, промывали TBS, последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами. Промывали и проявляли с помощью реагентов для хемилюминесценции на приборе MolecularImagerChemiDoc (Bio-Rad).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нокаут гена uPAR приводит к задержке восстановления периферических нервов у мыши. Для выяснения роли uPA и uPAR в регенерации периферических нервов использовали модель травматического пережатия общего малоберцового нерва *in vivo*. Функциональное восстановление нерва оценивали по его проводимости: измеряли длину латентного периода и

амплитуду суммарных потенциалов действия нерва (СПДН) мышей дикого типа (WT), нокаутных по урокиназе (uPA^{-/-}) и урокиназному рецептору (uPAR^{-/-}). При оценке СПДН на 7, 14 и 21 сутки после повреждения нерва наблюдался одинаковый рост амплитуды и укорочение латентного периода у мышей групп WT и uPA^{-/-}. Однако у мышей из группы uPAR^{-/-} обнаружено достоверное снижение амплитуды СПДН на 14 сутки и удлинение латентного периода на 7 сутки по сравнению с WT и uPA^{-/-} мышами (Рис. 1). На 21 сутки потенциалы действия были схожими во всех группах, поскольку большая часть нервных волокон, способных к регенерации, к этому моменту уже проросли к области регистрации СПДН, чем, предположительно, обусловлено отсутствие разницы.

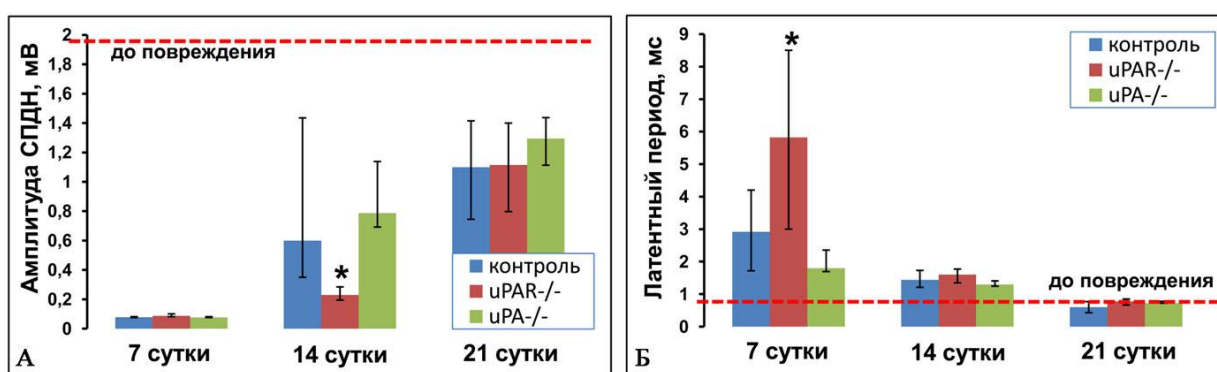


Рис. 1. Оценка проводимости травмированного нерва. А - амплитуда (в мВ); Б - латентный период (в мс). Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. Пунктирной линией отмечены значения параметров для интактного нерва. $n=4-9$, $*p<0,05$, ANOVA on Ranks.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что отсутствие uPAR, но не uPA вызывает задержку в функциональном восстановлении *n. Peroneus communis*. Известно, что амплитуда СПДН отражает количество функциональных нервных волокон, а латентный период характеризует степень ремиелинизации после повреждения. Поэтому далее мы провели морфологический анализ количества регенерирующих аксонов и пролиферацию Шванновских клеток.

У мышей, лишенных uPAR, снижается количество регенерирующих аксонов в нерве. Для морфологического анализа применяли иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных срезов интактных (неповрежденных) и травмированных нервов антителами к NF200, распознающими аксоны большого диаметра. Срезы травмированных нервов получали на расстоянии 2 мм дистальнее места повреждения. Различий в количестве аксонов в интактных нервах WT, uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей не

наблюдалось. После травмы обнаружено, что на всех сроках эксперимента количество аксонов у WT и у uPA^{-/-} мышей было одинаковым, в то время как у uPAR^{-/-} мышей мы обнаружили 4-кратное уменьшение количества аксонов по сравнению с WT и uPA^{-/-} мышами на 4-й день после травмы ($p < 0,05$). Статистически значимое различие в количестве аксонов у uPAR^{-/-} мышей по сравнению с WT и uPA^{-/-} мышами сохранялось до 14 дней после травмы (Рис. 2, 3). На 21 день детектировали тенденцию к снижению количества аксонов у uPAR^{-/-} мышей, однако достоверной разницы уже не наблюдалось. Полученные результаты показывают, что нокаут uPAR приводит к задержке в регенерации аксонов после травмы, что проявляется как функционально, так и морфологически. Нокаут же uPA не приводит к задержке в регенерации аксонов.

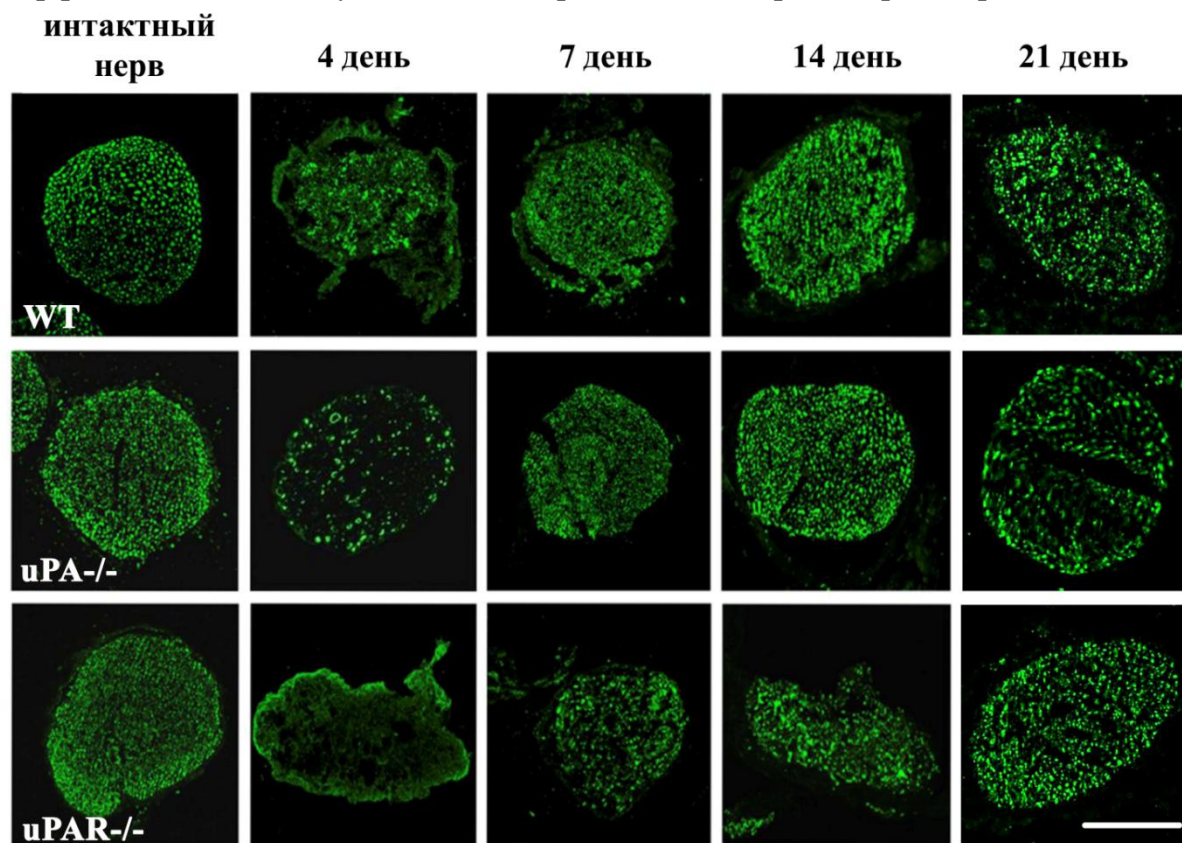


Рис. 2. Восстановление структуры периферического нерва после травмы. Иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных криосрезов нервов WT, uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей антителами к NF200. Представлены интактные нервы и нервы на 4,7,14 и 21 сутки после травмы. Масштабный отрезок = 250 мкм.

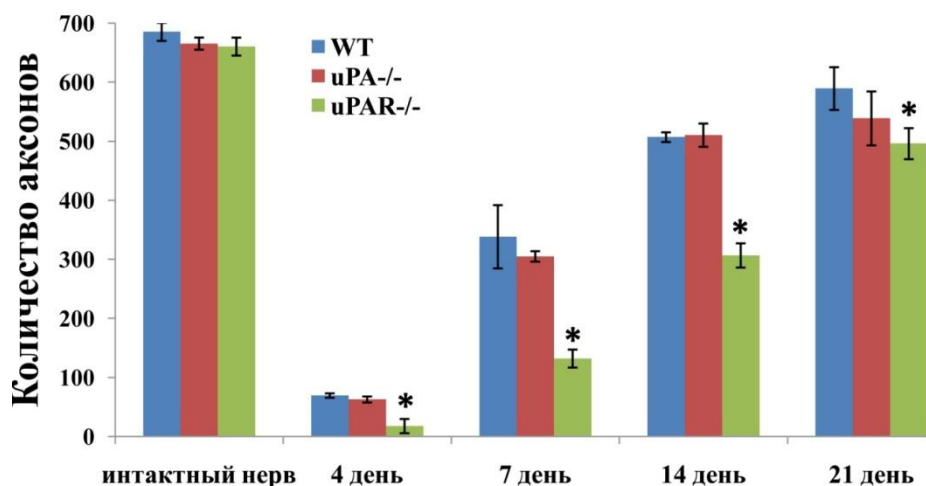


Рис. 3. Анализ количества NF200 положительных аксонов. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 4, *p < 0.05$, ANOVA).

Нокаут гена uPAR приводит к снижению пролиферации Шванновских клеток в регенерирующем нерве. Ремиелинизация поврежденного нерва происходит за счет активности Шванновских клеток (ШК), которые после травмы трансдифференцируются и экспрессируют GFAP - маркер незрелых ШК, (Namgung, 2014). При иммунофлуоресцентном окрашивании продольных срезов дистальной культи травмированных нервов антителами против GFAP и Ki67 (ядерного маркера пролиферации клеток) было обнаружено одинаковое количество клеток, экспрессирующих оба маркера, у WT и uPA-/- мышей и снижение данного показателя у uPAR-/- мышей, что свидетельствует об уменьшении пролиферации ШК у uPAR-/- мышей (Рис. 4,5).

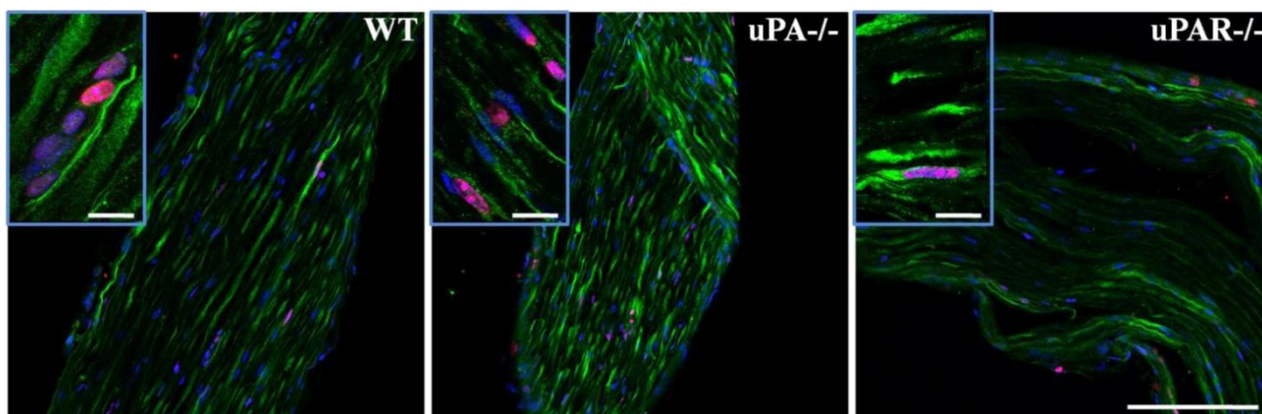


Рис. 4. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание продольных криосрезов нервов WT, uPA-/- и uPAR-/- мышей антителами к GFAP (зеленая флуоресценция) и Ki67 (красная флуоресценция) на 7 день после травмы. Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок = 150 мкм. На вставках представлены клетки, снятые на 63-кратном увеличении. Масштабный отрезок = 5 мкм.

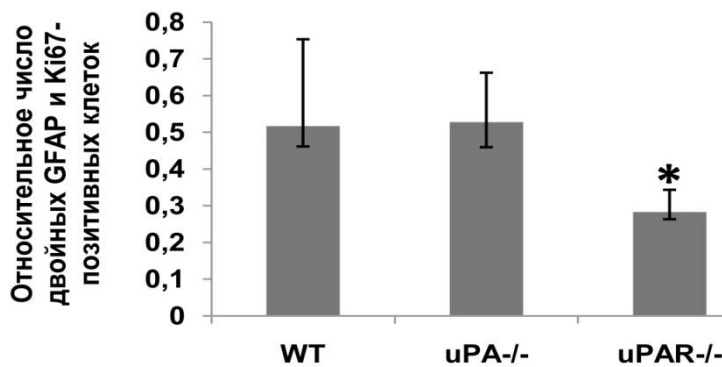


Рис 5. Отношение количества двойных GFAP и Ki67-положительных клеток к общему числу клеток. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. $n=6$, $*p<0.05$, ANOVA on Ranks.

При регенерации нерва увеличивается экспрессия и солокализация uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов. Мы наблюдали эффекты uPAR, не связанные с экспрессией uPA, что может свидетельствовать о наличии других партнеров uPAR, взаимодействие с которыми стимулирует регенерацию. Важную роль в регенерации нервов играют молекулы клеточной адгезии. Чтобы выявить возможные механизмы влияния uPAR на восстановление нервов, мы оценили уровень экспрессии uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в регенерирующих нервах. Мы провели двойное иммунофлуоресцентное окрашивание участков нерва, расположенных проксимальнее и дистальнее места повреждения, антителами против uPAR, $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринов на 4 сутки после травмы у uPA-/- и WT мышей. Мышей uPAR-/- в эксперимент не брали, так как предполагалось оценивать взаимодействие uPAR и интегринов. Мы обнаружили, что у uPA-/- мышей интенсивность флуоресценции uPAR повышалась в 2,4 раза, $\alpha 5$ -интегрина в 2,7 раз и $\beta 1$ -интегрина в 2 раза ($p<0.05$) по сравнению с WT мышами как в проксимальной, так и в дистальной частях нерва. Далее мы оценивали солокализацию uPAR с $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринами используя коэффициенты солокализации Мандерса M1 (доля флуоресценции uPAR во флуоресценции $\alpha 5$ -интегрина) и M2 (доля $\alpha 5$ -интегрина в uPAR). У WT мышей 55% uPAR солокализовалось с $\alpha 5$ -интегрином и 56% с $\beta 1$ -интегрином, в то время как у uPA-/- мышей солокализация uPAR с интегринами повышалась: 90% uPAR солокализовалось с $\alpha 5$ -интегрином и 80% - с $\beta 1$ -интегрином ($p<0.05$) (Рис. 6) (данные по окрашиванию $\beta 1$ -интегрина приведены в полном тексте диссертации). Повышенная экспрессия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов и их солокализация временно и пространственно совпадают с активной фазой регенерации нервов (Rivellini *et al.*, 2012). Эти данные свидетельствуют о физиологической значимости наблюдаемой солокализации, о возможной сборке функционального комплекса uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины и его участия в восстановлении нервов.

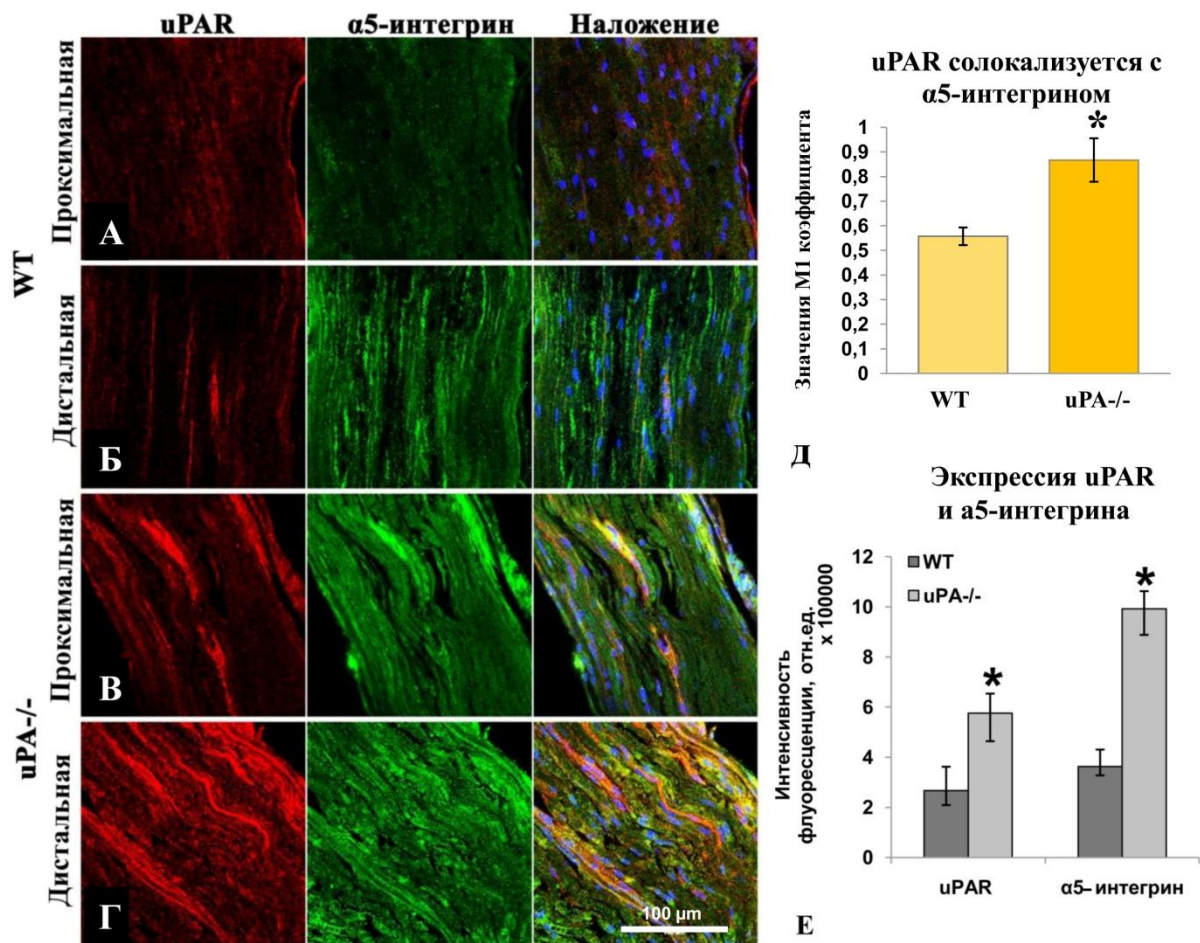


Рис. 6. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание проксимальной и дистальной частей нервов после повреждения WT мышей (А, Б) и uPA^{-/-} мышей (В, Г) с использованием антител к uPAR (красная флуоресценция) и $\alpha 5$ -интегрину (зеленая флуоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. Д – Анализ солокализации uPAR с $\alpha 5$ -интегрином. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. n=6, *p<0.05, T- тест. Е – Анализ интенсивности флуоресценции uPAR и $\alpha 5$ -интегрин в нервах от WT и uPA^{-/-} мышей. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. n=6, *p<0.05, ANOVA.

uPAR индуцирует сборку комплекса $\alpha 5\beta 1$ -интегринов на плазматической мембране клеток Neuro 2A. Для подтверждения релевантности полученных результатов *in vivo* о солокализации uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами мы перешли на модель нейритогенеза в культуре клеток N2A *in vitro* и оценили взаимодействие между uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринами на клеточной мембране. Клетки N2A подвергли сывороточной депривации для стимуляции нейритогенеза (Semina *et al.*, 2016) и анализировали экспрессию/солокализацию uPAR с $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринами на плазматической мембране методом иммунофлуоресцентного

окрашивания (Рис. 7) (данные по окрашиванию $\beta 1$ -интегрина приведены в полном тексте диссертации). Обнаружено, что гиперэкспрессия uPAR приводила к увеличению интенсивности флуоресценции $\beta 1$ -интегрина в 1,54 раз, а $\alpha 5$ -интегрина - в 1.8 раз ($p < 0.05$). При этом возрастала солоколизация как uPAR с $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринами, так и интегринов с uPAR по сравнению с контрольными клетками ($p < 0.05$). При подавлении экспрессии uPAR мы наблюдали снижение интенсивности флуоресценции $\beta 1$ -интегрина в 1.9 раз и $\alpha 5$ -интегрина - в 4,7 раза ($p < 0.05$), а также отсутствие солокализации.

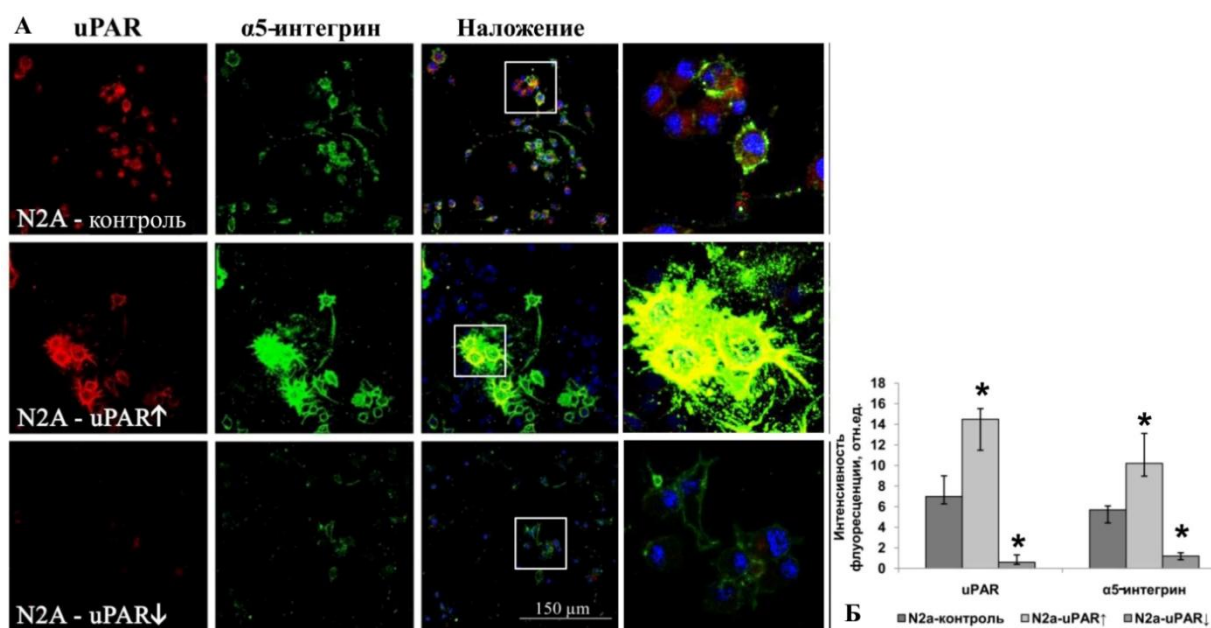


Рис. 7. А - двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток Neuro 2A антителами к uPAR (красная флуоресценция), $\alpha 5$ -интегрину (зеленая флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. Б – анализ интенсивности флуоресценции uPAR и $\alpha 5$ -интегрина в трех типах клеток. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. $n=6$, $p < 0,05$, ANOVA on Ranks.

Формирование комплекса uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины стимулирует нейритогенез.

Обнаружив солокализацию uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами, мы предположили, что их взаимодействие может иметь значение для формирования нейритов. uPAR латерально взаимодействует с α -субъединицей интегринов (Blasi *et al.*, 2002). Мы синтезировали пептид $\alpha 325$, специфически разобщающий это взаимодействие, но не меняющий функцию интегринов (Grove *et al.*, 2014). В эксперименте использовали клетки N2A с разным уровнем экспрессии uPAR (uPAR \uparrow , Δ uPAR и контрольные). Для подавления экспрессии uPAR использовали систему CRISPR/Cas9 (Δ uPAR).

Клетки N2A культивировали на фибронектине и подвергали сывороточной депривации для стимуляции нейритогенеза. В среду культивирования вносили uPA или блокирующий пептид α 325, или контрольный пептид s325. Через 72 часа подсчитывали количество клеток, сформировавших нейриты (нейритсодержащие клетки). Было обнаружено, что добавление разобщающего α 325 пептида к WT клеткам в 3,6 раз снижает количество клеток с нейритами по сравнению с контрольным s325 пептидом ($p=0,037$). Клетки же с нокаутом uPAR не отвечали на введение добавок. Однако мы обнаружили, что после добавления α 325 пептида, uPAR \uparrow клетки содержат достоверно меньше клеток с нейритами по сравнению с s325 пептидом ($p<0,05$). Также добавление uPA к uPAR-гиперэкспрессирующим клеткам увеличивало количество клеток с нейритами по сравнению с контрольной средой (Рис.8).

Следует отметить, что в отсутствие добавок (контрольная среда) в группе Δ uPAR количество клеток с нейритами было достоверно меньше, чем в группах WT и uPAR \uparrow ($p<0,01$). В тех же условиях разницы в количестве нейритсодержащих клеток между группами WT и uPAR \uparrow не наблюдалось. Введение контрольного s325 пептида не оказывало негативного влияния на клетки и нейритогенез по сравнению с контрольной средой, что говорит о специфичности действия α 325 пептида. Таким образом, мы показали, что взаимодействие uPAR и α 5 β 1-интегринов имеет важное значение для нейритогенеза.

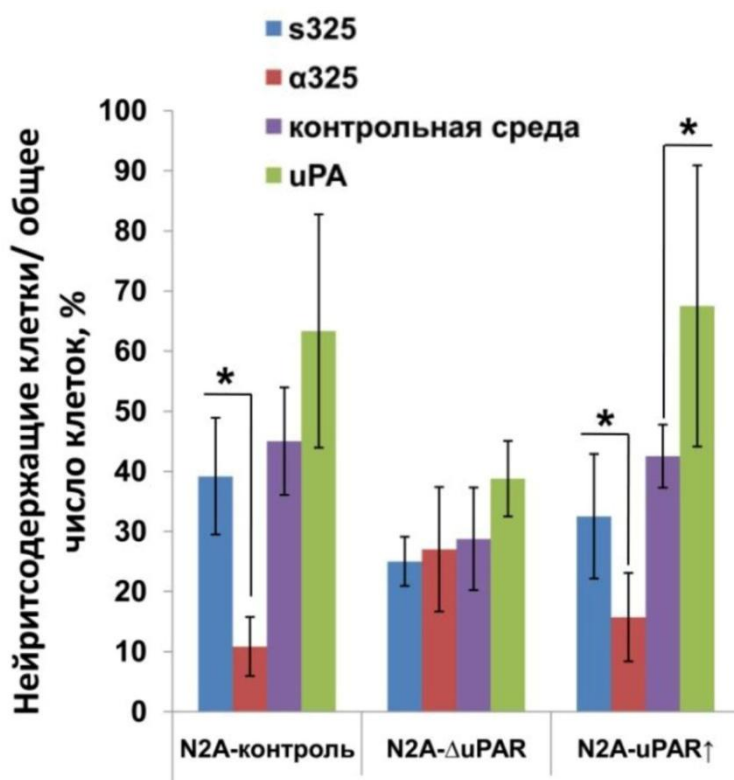


Рис 8. Оценка количества нейрит-содержащих клеток в культуре N2A на фибронектине в условиях культивирования в контрольной среде или после добавления разобщающего α 325 пептида, или контрольного s325 пептида, или uPA. Представлено отношение количества клеток, содержащих нейриты, к общему числу клеток. Данные представлены как

среднее \pm стандартное отклонение, n=6, *p<0,05, two-way ANOVA.

uPAR латерально взаимодействует с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами в клетках N2A

Для подтверждения прямого взаимодействия uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами в клетках N2A, мы провели реакцию совместной иммунопреципитации uPAR и $\alpha 5$ -интегрин, добавляя в среду культивирования разобщающий пептид $\alpha 325$ или контрольный пептид s325. Клетки N2A (WT и uPAR \uparrow) культивировали в среде, содержащей пептиды $\alpha 325$ или s325. Клетки лизировали и проводили ко-иммунопреципитацию, используя антитела к $\alpha 5$ -интегрину. Как в WT клетках, так и в клетках uPAR \uparrow взаимодействие uPAR- $\alpha 5$ -интегрин блокировалось в присутствии разобщающего пептида $\alpha 325$, но не контрольного s325 (Рис. 9). Эти результаты подтверждают прямое взаимодействие uPAR с $\alpha 5$ -интегрином в клетках N2A.

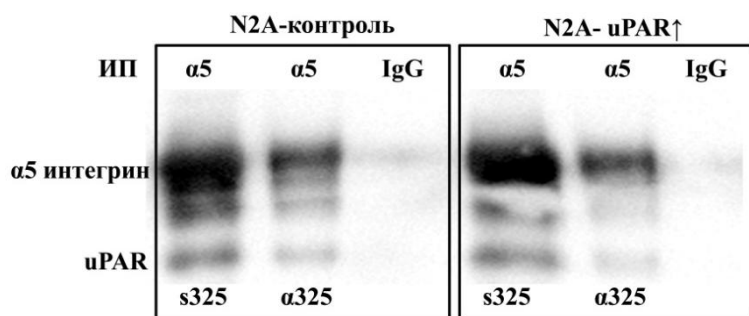


Рис.9. Анализ изменения содержания uPAR и $\alpha 5$ интегрин в иммунопреципитатах клеток N2A (WT и uPAR \uparrow) после обработки разобщающим пептидом $\alpha 325$ с

использованием метода Вестерн-блоттинга. ИП – антитела, используемые для реакции ко-иммунопреципитации, $\alpha 325$ - блокирующий пептид, s325 – контрольный пептид.

Растворимая форма uPAR (suPAR) обладает хемотактическими свойствами. Известно, что при регенерации аксоны растут по градиенту хемоаттрактантов (González-Pérez *et al*, 2013) Существуют растворимые формы uPAR (suPAR), способные стимулировать хемотаксис клеток, взаимодействуя с рецептором хемокинов FPRL1 (Blasi *et al*, 2002). Для изучения способности suPAR стимулировать рост нейритов с участием FPRL1 мы выделяли СГ из uPAR $-/-$ мышей, чтобы исключить эффекты эндогенного uPAR. СГ высаживали в Матригель и слева и справа от СГ добавляли капли Матригеля, в которые вносили следующие добавки: suPAR (1 нМ), пертуссис токсин (ПТ, 100 мкМ), блокирующий FPRL1, смесь ПТ и suPAR. Эксперимент включал 3 группы: 1 группа содержала Матригель с добавлением suPAR, 2 группа – Матригель с ПТ, 3 группа - смесь ПТ с suPAR с одной стороны, и suPAR с другой. Оценивали длину нейритов, растущих от СГ в сторону внесенных добавок. Оказалось, что

длина нейритов, растущих в сторону suPAR, достоверно больше длины нейритов, растущих в сторону без добавок ($p < 0.05$) (Рис. 10). Эти данные свидетельствуют о том, что uPAR обладает хемотактическим действием.

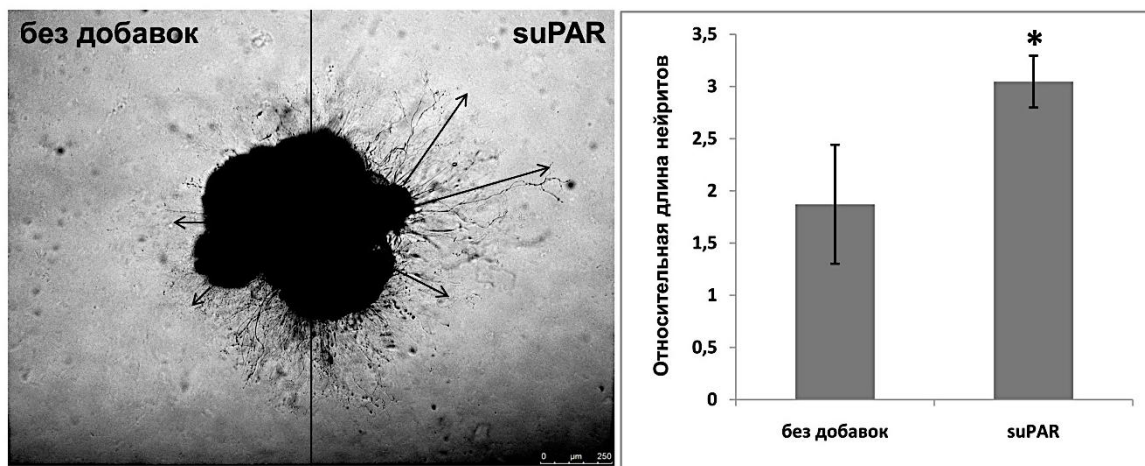


Рис. 10. Спинальный ганглий uPAR^{-/-} мыши, помещенный в каплю Матригеля. На микрофотографии справа от СГ нанесена капля Матригеля с suPAR, слева - капля Матригеля без добавок (контроль). Стрелками обозначено направление роста нейритов. Масштабный отрезок 250 мкм. На графике представлен анализ относительной длины нейритов, растущих от СГ по градиенту концентрации suPAR, по сравнению с контрольной стороной. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, * $p < 0.05$.

Длина нейритов, растущих в сторону ПТ (2 группа), была достоверно меньше длины нейритов, растущих в контрольную сторону ($p < 0.05$) (данные представлены в полной версии диссертации). Эти результаты подтверждают высказанное нами предположение об участии рецептора хемокинов FPRL1 в регуляции направленного роста аксонов.

В 3 группе введение ПТ приводило к достоверному уменьшению роста нейритов, вызванного suPAR ($p < 0.05$) (Рис. 11). Это может свидетельствовать о том, что хемотактические эффекты suPAR реализуются через рецептор FPRL1.

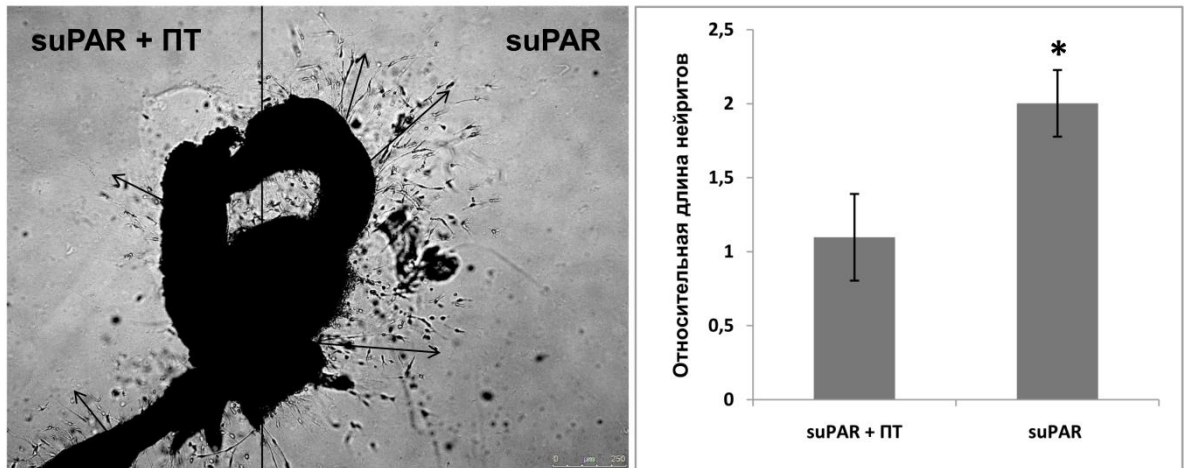


Рис. 11. Спинальный ганглий α PAR $^{-/-}$, помещенный в каплю Матригеля. На микрофотографии справа от СГ нанесена капля Матригеля с suPAR, слева – капля Матригеля, содержащего смесь ПТ и suPAR. Стрелками обозначено направление роста нейритов. Масштабный отрезок 250 мкм. На графике слева представлен анализ относительной длины нейритов, растущих от СГ по градиенту концентрации suPAR по сравнению со смесью ПТ и suPAR. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, * $p < 0.05$, ANOVA.

α PAR солокализуется с хемокиновым рецептором FPRL1 в нейронах.

Для подтверждения солокализации и возможного взаимодействия α PAR и хемокинового рецептора FPRL1 в регуляции направленного роста аксонов, мы выделяли первичную культуру нейронов из СГ, полученных от WT мышей, и иммунофлуоресцентно окрашивали антителами против α PAR и FPRL1. Мы обнаружили, что α PAR и FPRL1 экспрессируются как на конусе роста аксонов, так и в телах нейронов, более того мы наблюдали солокализацию α PAR и рецептора хемокинов FPRL1 (Рис. 12).

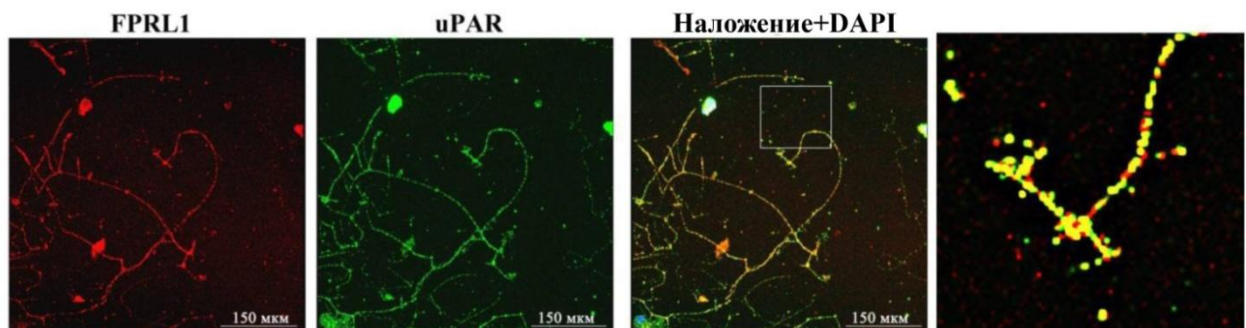


Рис 12. Иммунофлуоресцентное окрашивание первичной культуры нейронов мыши антителами к α PAR (зелёная флуоресценция) и FPRL1 (красная

флуоресценция). uPAR и FPRL1 экспрессируются и солокализуются в нейронах СГ, включая конус роста аксонов. На врезке справа - увеличенное изображение.

Суммарно эти данные свидетельствуют о том, suPAR регулирует направленный рост нейритов, взаимодействуя при этом с рецептором хемокинов FPRL1.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что нокаут гена урокиназного рецептора, но не гена урокиназы, приводит к задержке в структурном и функциональном восстановлении нерва после повреждения, а именно к снижению количества регенерирующих аксонов, снижению пролиферации Шванновских клеток, снижению амплитуды потенциалов действия и увеличению латентного периода.

3. Впервые показано, что рецептор урокиназы регулирует направленный рост аксонов и их ветвление, а растворимая форма урокиназного рецептора обладает хемотактическими свойствами в нейритогенезе.

2. Обнаружено увеличение экспрессии и солоколизации урокиназного рецептора с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами в регенерирующих нервах, а разобщение их взаимодействия приводит к нарушению формирования нейритов.

4. Установлено, что урокиназный рецептор проявляет хемотактические свойства за счет взаимодействия с рецептором хемокинов FPRL1.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

1. Semina E.V., Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Rysenkova, K.D., **Klimovich, P.S.**, Plekhanova, O.S., Tkachuk V.A. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching // *European Journal of Cell Biology*. — 2016. — Vol. 95, no. 9. — P. 295–310. IF (WoS) = 3,024.
2. **Klimovich, P.S.**, Semina E. V., Karagyaur M. N., Rysenkova K. D., Sysoeva V. Yu, Mironov N. A., Sagaradze G. D., Az'muko A. A., Popov V. S., Rubina K. A., Tkachuk V. A. Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2020 – Vol 125, no.1 – P. 1–20. IF (WoS) = 3.743.
3. **Климович П. С.**, Семина Е. В. Механизмы участия урокиназного рецептора в направленном росте аксонов // *Молекулярная биология*. — 2020. — Т. 54, № 1. — С. 1–11. IF (РИНЦ) = 0,977
4. **Klimovich, P.S.**, Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Semina E.V. Three-dimensional model of dorsal root ganglion explant as a method of studying neurotrophic factors in regenerative medicine // *Biomedicines*. — 2020. — Vol. 8, no. 49 — P. 1–14. IF (WoS) = 3,6.
5. Karagyaur M.N. , Rostovtseva A., Semina E.V., **Klimovich P.S.**, Balabanyan V. Yu., Makarevich P.I., Popov V.S., Stambolsky D.V., Tkachuk V.A. A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen

activator stimulates peripheral nerve regeneration after injury // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. — 2020. — Vol. 372, no. 3. — P. 248-255. IF (WoS) = 3.867.

6. Semina E. V., Rubina K. A., Shmakova A. A., Rysenkova K. D., **Klimovich P. S.**, Aleksanrushkina N. A., Sysoeva V. Yu., Karagyaur M. N., Tkachuk V. A. Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma // *Journal of Cellular Physiology* — 2020. — Vol. 1 — P. 1–19. IF (WoS) = 4.522.

Тезисы докладов и стендовых сообщений

1. **Климович П. С.**, Семина Е. В., Сысоева В. Ю., Рубина К. А., Ткачук В. А. Трехмерные 3D тканевые экспланты спинальных ганглий как модель для изучения регенерации нервной ткани // *Сборник тезисов 12го Национального Конгресса по регенеративной медицине* — Москва, 2015. — С. 96–96.
2. **Климович П. С.**, Семина Е. В., Рысенкова К. Д., К. А. Рубина К. А., Ткачук В. А. Зависимость формирования, скорости роста и ветвления аксонов от активности урокиназной системы // АСТА NATURAE. — Т. 1 *СПЕЦВЫПУСК*. — 2016. — С. 46.
3. **Климович, П. С.**, Семина, Е. В., Карагяур, М. Н., Рысенкова, К. Д., Рубина, К. А. Регенерация нервов зависит от взаимодействия урокиназного рецептора с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами // *Гены и клетки. Материалы III национального конгресса по регенеративной медицине*, Москва, 15-18 ноября 2017. — Т. 12 из 2313-1829. — Институт Стволовых клеток человека, 2017. — С. 120–120.
4. **Klimovich, P. S.**, Semina, E. V., Karagyaur, M. N., and Rubina, K. A. The role of urokinase receptor and its interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrins in nerve regeneration // *Biochemistry & Molecular Biology Journal*. — 2018. — Vol. 4. — P. 51–51.
5. **Климович, П. С.**, Семина, Е. В. Навигационные свойства урокиназного рецептора в росте аксонов // АСТА NATURAE. — Т. 1 из *СПЕЦВЫПУСК*. — 2019. — С. 74–74.
6. **Климович, П. С.**, Семина, Е. В. Взаимодействие рецептора урокиназы uPAR с рецептором хемокинов FPRL регулирует направление роста аксонов // *Гены и Клетки - Материалы IV Национального Конгресса по Регенеративной Медицине*. Москва, 20–23 ноября 2019 года. — Т. 14. — Институт Стволовых Клеток Человека Москва, Россия, 2019. — С. 112–113.

Список сокращений

FPR - formyl peptide receptor, рецептор fMLP-хемокина

GDNF - glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный фактор роста нервов

NF200 - neurofilament-200

NGF - nerve growth factor, фактор роста нервов

uPA - urokinase plasminogen activator, урокиназный активатор плазминогена

uPAR - urokinase plasminogen activator receptor, рецептор урокиназного активатора плазминогена

ВКМ - внеклеточный матрикс

мВ – милливольт

мс- миллисекунда

ПНС - периферическая нервная система

ПТ – пертусис токсин, коклюшный токсин

СГ – спинальный ганглий

СПДН - суммарный потенциал действия нерва

ШК - Шванновские клетки