

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Климович Полина Сергеевна

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

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., доцент Рубина К.А.

к.б.н. Семина Е.В.

Москва- 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
Краткий обзор строения периферического нерва.....	15
Общие механизмы регенерации периферических нервов	17
Структура урокиназной системы.....	24
Протеолитическая активность uPA/uPAR	28
Непротеолитические функции uPA/uPAR.....	31
Интерактом uPAR и его регуляция	32
Взаимодействие uPAR-витронектин	32
Взаимодействие uPAR-FPR1.....	33
Взаимодействие uPAR-LRP	34
Взаимодействие uPAR-интегрины	35
Функциональная характеристика интегринов	36
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
Антитела и реагенты	43
Животные	44
Модель повреждения периферического нерва.....	44
Оценка эффективности регенерации периферического нерва после травмы	45
Оценка функционального восстановления нерва.....	45
Получение криосрезов нервов	47
Иммунофлуоресцентное окрашивание	47
Конфокальная микроскопия.....	48
Выделение спинальных ганглиев мыши.....	49
Выделение первичной культуры нейронов из спинальных ганглиев мыши.....	49
Клеточные культуры.....	50
Подавление и гиперэкспрессия uPAR в клетках Neuro2A.....	50

Получение клеток нейробластомы мыши N2A с подавленной экспрессией uPAR методом CRISPR/CAS9.....	51
Фракционирование клеточных лизатов	52
Метод Вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга).....	52
Получение лизатов клеток	52
Определение концентрации белка в лизатах клеток	53
Вестерн блоттинг.....	53
Эксперимент по разобщению взаимодействия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ интегринов в культуре клеток N2A	54
Синтез пептидов	54
Реакция ко-иммунопреципитации.....	57
Статистический анализ.....	57
РЕЗУЛЬТАТЫ*	59
Ингибирование uPA и uPAR снижает рост аксонов из эксплантов спинальных ганглиев в Матригель.....	59
Нокаут uPA приводит к увеличению площади, занимаемой отрастающими от спинальных ганглиев нейритами.....	60
Нокаут гена uPAR приводит к задержке восстановления периферических нервов у мыши.....	61
У мышей, лишенных uPAR, снижается количество регенерирующих аксонов в нерве.....	65
Нокаут гена uPAR приводит к снижению пролиферации Швановских клеток в регенерирующем нерве.....	68
Уровень экспрессия $\alpha 5\beta 1$ -интегринов коррелирует с экспрессией uPAR в интактных нервах.....	70
При регенерации нерва увеличивается экспрессия и солокализация uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов.....	74
Получение клеточной линии N2A с гиперэкспрессией и с подавленной экспрессией гена uPAR.....	78
uPAR индуцирует сборку комплекса $\alpha 5\beta 1$ -интегринов на плазматической мембране клеток N2A.....	79
uPAR латерально взаимодействует с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами в клетках N2A.	86
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	98

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА - иммуноферментный анализ

мВ - милливольт

ММП - матриксные металлопротеиназы

мс- миллисекунда

ПНС - периферическая нервная система

ПТ – пертусис токсин, коклюшный токсин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПДН - суммарный потенциал действия нерва

СГ – спинальный ганглий

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФСБ, PBS – фосфатно-солевой буфер

ЦНС - центральная нервная система

ШК – Шванновские клетки

BDNF - brain-derived neurotrophic factor, мозговой фактор роста нервов

DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол, маркер ДНК

DMEM - dulbecco's Modified Eagle Medium, среда Игла, модифицированная Дульбекко

EGF - epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста

FPR - formyl peptide receptor, рецептор fMLP-хемокина

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

GPI – glycosphosphatidylinositol, гликозилфосфатидилинозитол

HBSS - hank's Balanced Salt Solution, раствор Хэнкса

MMP2 – matrix metalloproteinase 2, матриксная металлопротеиназа 2 типа

MMP9 - matrix metalloproteinase 9, матриксная металлопротеиназа 9 типа

NF200 - neurofilament-200

NGF - nerve growth factor, фактор роста нервов

PAI-1 - plasminogen activators inhibitor-1, ингибитор активаторов плазминогена

shRNA - short hairpin RNA, короткие шпилечные РНК олигонуклеотиды

tPA - tissue plasminogen activator, тканевой активатор плазминогена

uPA - urokinase plasminogen activator, урокиназный активатор плазминогена

uPAR - urokinase plasminogen activator receptor, рецептор урокиназного активатора плазминогена

VEGF - vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

В современной биологии хорошо изучены фундаментальные основы отдельных молекулярных процессов, происходящих в эмбриогенезе при формировании нервной системы и во взрослом организме при регенерации нервов; однако, отсутствует интегральный взгляд на комплексные процессы, происходящие при восстановлении периферических нервов. Существующие терапевтические подходы малоэффективны даже при легких травмах нервов, тогда как при тяжелых или сочетанных травмах полноценное восстановление нерва и иннервации органа остаются проблемой [1]. Например, дистальное повреждение пальцевого нерва, приводящее к потере чувствительности кончика пальца, поддается восстановлению, в то время как проксимальная травма плечевого сплетения приводит к нарушению чувствительности руки, снижению моторной функции и хронической боли [1]. В этой связи изучение молекулярных и клеточных механизмов регенерации периферических нервов, остается актуальной задачей биологии и медицины.

Периферическая нервная система (ПНС) обладает способностью к регенерации. Травмы ПНС чаще всего связаны с механическим повреждением, реже - с хирургическим вмешательством. Различные факторы влияют на способность периферических нервов к регенерации: локализация повреждения, скорость и направление роста регенерирующих нейритов, пролиферация Шванновских клеток (ШК), выживаемость нейронов, взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ), возможная атрофия органов/тканей-мишеней и нарушение реиннервации [1, 2].

Для нормального протекания регенерации критическим являются скорость роста нейритов и взаимодействие между растущими нейритами и ШК, которое должно быть обеспечено в полном объеме и в нужный момент

времени, так как его задержка может приводить к апоптозу нейронов, дегенерации аксонов и нарушению иннервации мишеней [2, 3].

В процессах восстановления периферической нервной системы, выживание нейронов, рост нейритов и их взаимодействие со ШК обеспечиваются нейротрофическими факторами, такими как NGF, GDNF и др [4].

Также последнее время внимание исследователей привлекают, навигационные молекулы, которые играют важную роль в развитии нервной и кровеносной систем в эмбриогенезе, а также процессах их регенерации после повреждения. Нейтрины, эфрины, семафорины, обладая хемоаттрактивным или репульсивным («отталкивающим») действием, определяют направление роста регенерирующих нейритов к мишеням и правильность формирования синапсов [5].

Адгезия регенерирующих нейритов и ориентация конуса роста обеспечивается интегринами и их лигандами (белками ВКМ), которые широко экспрессируются в центральной нервной системе (ЦНС) и ПНС и выполняют различные функции в формировании и дифференцировке нейронов и регенерации нервной ткани [6].

Большой вклад вносит система активаторов плазминогена, урокиназа uPA и ее рецептор uPAR, тканевой активатор плазминогена tPA, которые стимулируют регенерацию нервных волокон за счет деградации фибрина и матриксных белков, ингибирующих рост нейритов [7, 8]. Также они способствуют высвобождению нейротрофинов и цитокинов из окружающего матрикса и их последующей активации. Способность урокиназного рецептора связывать компоненты ВКМ также позволяет отнести его к классу молекул клеточной адгезии [9].

uPA и uPAR, взаимодействуя с интегринами, модулируют внутриклеточную сигнализацию, регулирующую адгезию, миграцию, пролиферацию и выживаемость клеток, и это не связано с протеолитической активностью uPA [10-13].

За направление роста нейритов и миграцию глиальных клеток также отвечают хемокиновые рецепторы. Известно, что урокиназный рецептор обладает хемотактическими свойствами и может стимулировать хемотаксис клеток [14].

Таким образом, регенерация поврежденных периферических нервов является многоступенчатым процессом со сложной молекулярно-биологической и клеточной системой регуляции. Из данных литературы известно, что урокиназный рецептор способен модулировать функции множества белков, участвующих в регенерации [15]. В этой связи изучение молекулярно-биологических, клеточных и биохимических механизмов участия урокиназной системы в процессах регенерации периферических нервов представляет большой интерес как с точки зрения получения фундаментальных знаний, так и для решения практических задач регенеративной медицины.

Степень разработанности темы.

Известно, что урокиназа и урокиназный рецептор 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 и повышенной судорожной активности у мыши. Полиморфизмы генов uPA/uPAR у человека приводят к нарушению развития структур головного мозга и расстройству когнитивных функций. Во взрослом организме в норме uPA и uPAR экспрессируется в ЦНС 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.

Зависимость между протеолитической активностью uPA, составом ВКМ и регенерацией нерва была обнаружена при исследовании биопсий периферических нервов пациентов, страдающих нейропатиями. Несмотря на полученные данные об участии урокиназной системы в регенерации, на данный момент механизмы влияния uPAR/uPA на регенерацию нервов в ПНС остаются малоизученными.

Цель исследования:

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

Задачи исследования:

Для достижения цели сформулированы следующие **задачи**:

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 травмированный малоберцовый нерв мышей линии C57Bl, нокаутных по генам урокиназы и урокиназного

рецептора, **предмет исследования** - урокиназная система и ее взаимодействие с латеральными партнерами.

Научная новизна работы.

В результате проведенных исследований были описаны новые функции урокиназной системы. В частности, продемонстрировано, что помимо того, что uPA и uPAR стимулируют рост нейритов, uPAR регулирует траекторию роста аксонов *ex vivo* и *in vitro*. Данные эффекты реализуются при взаимодействии uPA с uPAR и не зависят от протеолитической функции uPA. Впервые продемонстрированы функции uPAR в регенерации периферических нервов, не зависящие от uPA. Было показано, что при травме периферических нервов именно отсутствие uPAR, но не uPA, замедляет регенерацию *in vivo*. При этом у животных, нокаутных по гену uPAR, замедляется функциональное восстановление нерва, снижается количество регенерирующих аксонов и пролиферирующих швановских клеток. Нокаут урокиназы приводит к увеличению экспрессии uPAR в спинальных ганглиях и периферических нервах. При этом повышение экспрессии uPAR приводит к увеличению солокализации uPAR с $\alpha 5\beta 1$ интегринами. Таким образом, обнаружен новый механизм участия uPAR в регенерации нервов и в нейритогенезе за счет регуляции экспрессии $\alpha 5\beta 1$ интегринов. Доказано, что для стимуляции нейритогенеза необходимо латеральное взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ интегрином.

Теоретическое и практическое значение.

Полученные результаты расширяют понимание фундаментальных молекулярно-клеточных механизмов роста и регенерации нервов. Исследуемые компоненты урокиназной системы могут стать перспективной мишенью для разработки лекарственных препаратов для стимуляции восстановления поврежденных периферических нервов. Помимо этого, в работе представлены новые модели изучения регенерации и направленного роста нейритов *ex vivo*, которые могут быть использованы в исследовательских и практических целях. Данные, полученные в ходе

выполнения настоящего исследования, были включены в педагогическую программу на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова.

Методология и методы диссертационного исследования.

Проведенные исследования базируются на современных методологических приемах научного познания. Методология основывается на анализе данных литературы и степени разработанности данной темы, постановке цели и задач исследования исходя из функций урокиназной системы в клетках и тканях организма, планировании экспериментов на основании современных методов, применяемых в биологической науке. В ходе исследования применены проверенные биохимические (ИФА, ПЦР, Вестерн-блоттинг), цитологические (выделение и культивирование клеток, клеточные модели нейритогенеза), физиологические (модель травмы нерва и оценка потенциалов действия нерва при регенерации), гистологические методы (иммунофлуоресцентное окрашивание, эксплантная модель регенерации нейритов) и статистические методы анализа полученных данных. Полностью методология и методы отражены в разделе «Материалы и методы».

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.

б. Растворимая форма suPAR, взаимодействуя с рецептором FPRL1, является хемоаттрактаном для растущих нейритов.

Личный вклад соискателя состоит в анализе данных литературы, в проведении экспериментов, обработке полученных результатов и их интерпретации, подготовке публикаций, презентации данных на российских и международных конференциях.

Степень достоверности результатов диссертации обеспечивается использованием современных цитологических, гистологических и биохимических методов, а также методов статистической обработки данных, публикацией полученных результатов в рецензируемых российских и зарубежных научных журналах. Все эксперименты были многократно повторены, полученные результаты воспроизводимы.

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 двухгодичном германо-российском симпозиуме «Совместное заседание Берлинско-Бранденбургской академии наук и гуманитарных наук и Российской академии наук» в Москве (6-7 апреля 2017), Всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2018: фундаментальная наука как основа клеточных технологий» в Санкт-Петербурге (15-17 ноября 2018), международной конференции Биохимия, Молекулярная биология и Аллергия (Biochemistry, Molecular Biology and Allergy) в Амстердаме (11-12 октября 2018).

Доклад был заслушан на кафедре клеточной биологии, цитологии, гистологии 15 января 2020 г. Апробация работы была проведена на заседании

кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова 24 января 2020 г., протокол №24/01.

Публикации

Результаты данной работы были представлены в виде 6 статей: 5 в высокорейтинговых международных журналах, одной статье в российском журнале, 15 тезисов.

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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Краткий обзор строения периферического нерва

Периферическая нервная система (ПНС) млекопитающих состоит из нервов, передающих электрический импульс от центральной нервной системы (ЦНС) к различным органам и тканям организма (эфферентные пути) и в обратную сторону, т.е. от органов и тканей к ЦНС (афферентные пути) [16].

Клетки нервной ткани делят на нейроны и клетки глии. Тела нейронов расположены в головном и спинном мозге, в ганглиях (чувствительные и симпатические нейроны) и в ядрах (моторные нейроны черепных нервов). От тела нейрона отходят отростки, аксоны и дендриты, длина которых может достигать 1 метра. По структуре нерв напоминает электрический кабель, причём в роли «проводов» выступают аксоны нервных клеток, а «изоляцию» обеспечивают глиальные клетки, представленные в ПНС шванновскими клетками [3, 16].

Шванновские клетки (ШК) окружают аксоны, изолируя их друг от друга, и регулируют концентрацию ионов во внеклеточной среде, обеспечивая проведение нервного импульса [2]. По типу взаимодействия с аксонами ШК делятся на миелинизирующие и немиелинизирующие [17]. В процессе онтогенеза незрелые ШК могут как стать миелин-продуцирующими клетками, так и не синтезировать миелин [18]. Все нервные волокна делятся на миелинизированные и безмиелиновые [17]. Миелинизированное нервное волокно состоит из единственного аксона, покрытого миелиновой оболочкой, синтезируемой ШК; нервное волокно без миелиновой оболочки представляет собой множество аксонов, покрытых снаружи оболочкой одной ШК [2] (Рис.1). Миелиновая оболочка изолирует аксон, улучшает его способность проводить возбуждение и обеспечивает быструю сальтаторную передачу импульсов со скоростью 3-120 м/с, в то время как проведение импульса по безмиелиновому волокну происходит со скоростью 0,2-2 м/с. [19]. Миелин

представляет собой богатую липидами специальную структуру, состоящую из фосфолипидов, холестерина и основного белка миелина [18].

Контакт ШК с мембраной аксона или дендрита, опосредуется поверхностными белками (Nogo-66, MAG, Omgr, рецепторы нейрегулинов erbB2 и erbB3) и мембранными рецепторами нервных волокон (рецепторный комплекс NgR-p75 и T-кадгерин, нейрегулины) [20-22]. Данные контакты регулируют элонгацию аксонов, дифференцировку незрелых ШК и синтез миелина [3]. Таким образом, ШК и нейроны ПНС взаимодействуют друг с другом во время роста аксонов и передачи импульса по ним, а также при повреждении и регенерации периферических нервов [16].

Нервное волокно окружено эндоневрием - соединительной тканью, содержащей фибробласты, коллаген, ретикулярные волокна и иные компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) [3]. Эндоневральные трубки состоят из листков базальной мембраны, обёрнутых вокруг контактов шванновских клеток с аксоном. Базальная мембрана, синтезируемая ШК, представляет собой вариант ВКМ, состоящий из коллагена IV типа, ламинина и фибронектина [23]. Пучок нервных волокон покрыт периневрием, состоящим из коллагеновых волокон, а весь периферический нерв целиком — эпиневрием, содержащим кровеносные и лимфатические сосуды [3]. В процессе роста, аксоны контактируют с белками базальной мембраны эндоневрия и поверхностными маркерами ШК – такими, как фибронектин и ламинин. Со стороны аксонов нейронов и ШК взаимодействие с ВКМ обеспечивают N-кадгерин, L1/Ng-CAM (семейство L1 молекул адгезии нейроглии) и интегрины [3].

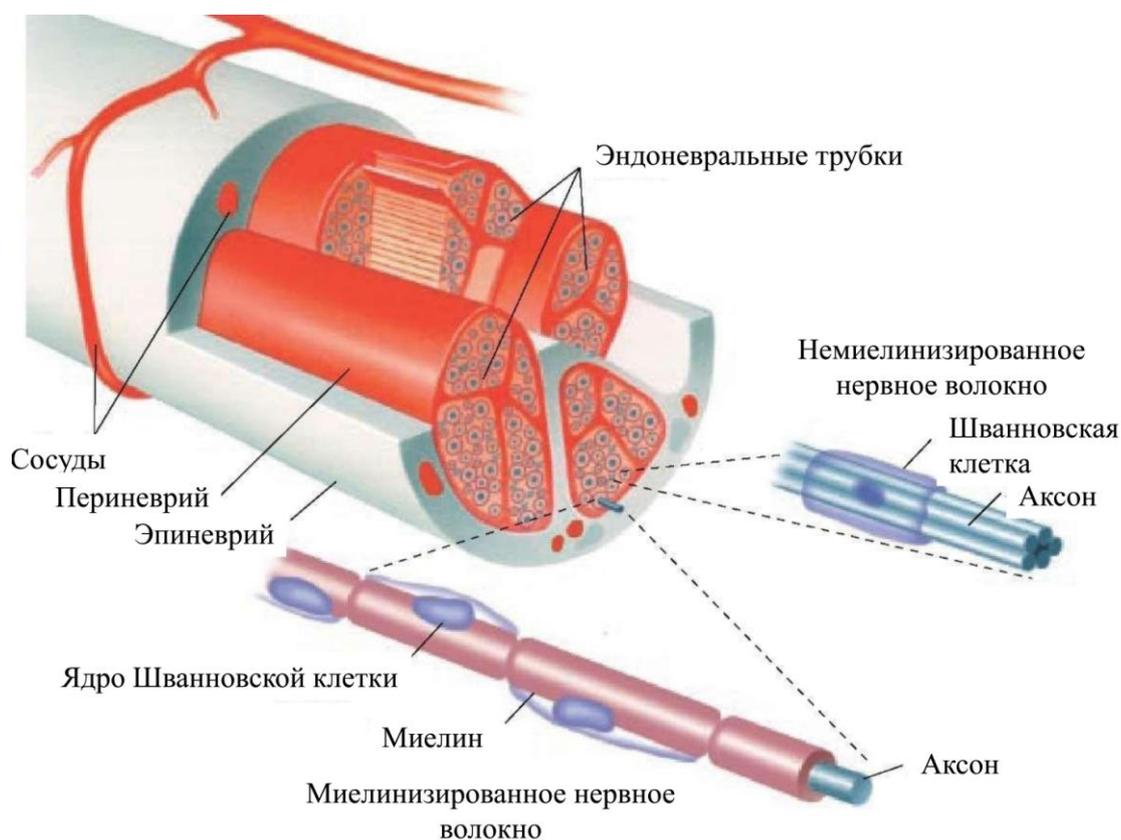


Рис. 1. Схема строения периферического нерва. (Адаптировано из <https://www.getbodysmart.com/nerves/nerve-structure>)

Общие механизмы регенерации периферических нервов

При травме периферического нерва, нервные волокна дистальнее места повреждения теряют связь с телом нейрона и подвергаются т.н. Валлериановской дегенерации. При этом периферические органы и ткани остаются денервированными [24]. При сохранении целостности миелиновой оболочки нерва функциональная регенерация чаще всего протекает нормально; если же нерв полностью рассечён, то это может приводить как к нарушению роста регенерирующих аксонов и неселективной реиннервации, так и к образованию соединительнотканного рубца. При этом орган или ткань остаются неиннервированными [25-27].

Совокупность изменений в проксимальном и дистальном отрезках поврежденного нерва: изменение фенотипа нейронов и ШК, фрагментация и фагоцитоз погибших аксонов и миелина, дегенерация волокон

проксимального отрезка нерва получила название Валлериановской или Валлеровской дегенерации (Wallerian degeneration) [28].

На первом этапе Валлериановской дегенерации повреждение приводит к быстрому входу ионов натрия и кальция через повреждённую аксоплазму, активации цАМФ, которая инициирует хроматолизис (лизирование телец Ниссля - цистерн эндоплазматического ретикулума) и разрушение цитоскелета [2]. Затем нарушается ретроградный транспорт нейротрофических факторов от иннервируемых органов и тканей, который происходит в норме [29]. К примеру, резкое падение транспорта эндогенного NGF (nerve growth factor, фактор роста нервов) в тело нейрона передаёт информацию об отсутствии иннервации мишени [30]. Есть и положительные сигналы, поступающие в тело нейрона при ретроградном транспорте. Повреждение аксона позволяет белкам, выделяемым ШК и клетками воспаления, проникать в аксоплазму; среди них такие факторы роста, как CNTF (ciliary neurotrophic factor, цилиарный нейротрофический фактор), FGF (fibroblast growth factors, факторы роста фибробластов), и нейротрофин-3, при этом происходит увеличение содержания вторичных посредников (цАМФ и цГМФ) и активация сигнальных каскадов митоген-ассоциированных протеинкиназ (МАРК) [2, 31, 32]. Все эти изменения запускают нейритогенез, а также повышают экспрессию различных транскрипционных факторов (c-Jun, Sox11, STAT3 и др.), переключающих фенотип нейрона с передачи нервного импульса на рост и регенерацию [33].

Параллельно с изменениями в нейронах, окружающие их ШК, расположенные дистальнее места повреждения, претерпевают трансформацию фенотипа из миелинизирующего в пролиферирующий. При этом увеличивается экспрессия NGF, рецептора p75, Glia Maturation Factor- β (GMF- β), молекул клеточной адгезии NCAM и L1 и уменьшается экспрессия миелин-ассоциированного белка (myelin-associated glycoprotein-MAG) и основного белка миелина (myelin basic protein-MBP, P0 и PMP22), [34]. ШК

фагоцитируют деградирующий миелин (чтобы затем использовать его для ремиелинизации [35]), пролиферируют и мигрируют в область повреждения [36].

После завершения процесса Валериановской дегенерации выжившие нейроны начинают восстанавливать нервные отростки. Восстановление поврежденного аксона включает в себя его трансформацию в высокоподвижную структуру с т.н. «конусом роста» на конце. Конус роста обеспечивает удлинение аксона за счёт анализа сигналов, поступающих от микроокружения [2] (Рис. 2). Аксон вытягивается по пути эндоневральных трубок дистальной части нерва, чтобы в конечном итоге реиннервировать периферические органы-мишени. Ориентация конуса роста аксона определяется градиентами нейротрофических факторов, которые вырабатываются в основном ненейрональными клетками, и навигационных молекул, таких как Эфрины (Ephrin) и их рецепторы (Eph), Нейропилины (NRPs) и Плексины (Plexin-D1), которые связывают Семафорины (Semaphorins), Robo 4, которые взаимодействуют со Слит белками (Slit), и UNC5B рецепторы, связывающие Нетрины (Netrins) [37]. Молекулярные сигналы, которые регенерирующий аксон получает в месте повреждения и в области культивации дистального нерва, могут обладать как хемоаттрактивными, так и хеморепульсивными свойствами.

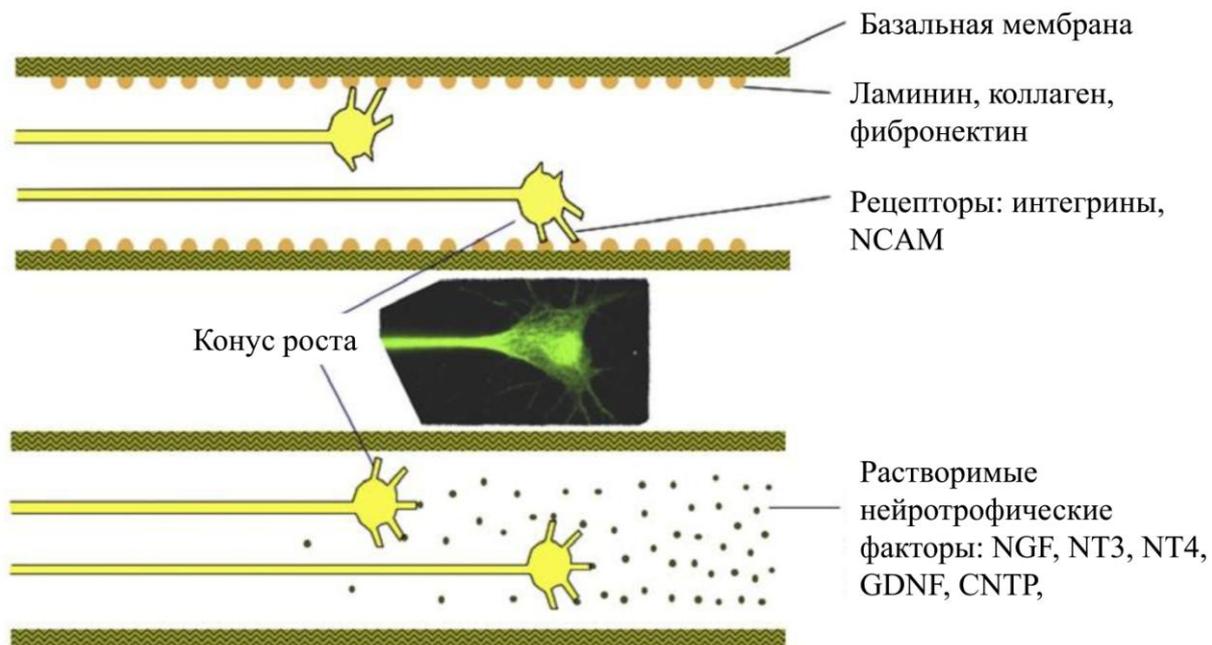


Рис. 2. Удлинение конуса роста аксона. По мере прорастания конус роста получает молекулярные сигналы от диффундирующих нейротрофических факторов, рецепторов клеточной адгезии и компонентов ВКМ. Адаптировано из González-Pérez, F.J., Udina, E., & Navarro, X. (2013). Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. *International review of neurobiology*, 108, 257-75 . NCAM - neural cell adhesion molecule, невральная молекула межклеточной адгезии; NGF - nerve growth factor, фактор роста нервов, GDNF - glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный фактор роста нервов, NT3 – neurotrophin-3, нейротрофин-3, NT4 – neurotrophin-4, нейротрофин-4, CNTF - ciliary neurotrophic factor, цилиарный нейротрофический фактор.

Ответ конуса роста также определяется белками ВКМ и располагающимися на мембране аксона молекулами клеточной адгезии – кадгеринами, интегринами, селектинами. Интегрины, взаимодействуя с компонентами ВКМ, активируют киназу фокальных контактов (ФАК) и интегрин-связанную киназу (ILK), которые в свою очередь активируют малые ГТФазы, приводящие к изменению подвижность конуса роста и ремоделирование цитоскелета [2, 38, 39]. При этом происходит постоянная

перестройка цитоскелета растущего аксона, преимущественно микротрубочек и микрофиламентов: увеличивается экспрессия актина, тубулина и периферина и понижаются уровни нейрофиламентов, регулирующих диаметр аксона [2].

Элонгация аксона и подвижность конуса роста зависят от баланса полимеризации и деполимеризации актиновых филаментов. Когда мембрана конуса роста формирует адгезивный контакт, интегрины передают сигнал на актиновый цитоскелет, что приводит к полимеризации микротрубочек и актиновых филаментов [40]. Перестройка цитоскелета регулируется компонентами семейства малых ГТФаз: Rac, Cdc42 и Rho [41]. Вклад компонентов цитоскелета в регенерацию аксона является определяющим: все внешние факторы и все сигнальные пути, регулирующие этот процесс, в той или иной степени влияют на перестройку цитоскелета [42, 43] (Рис. 3).

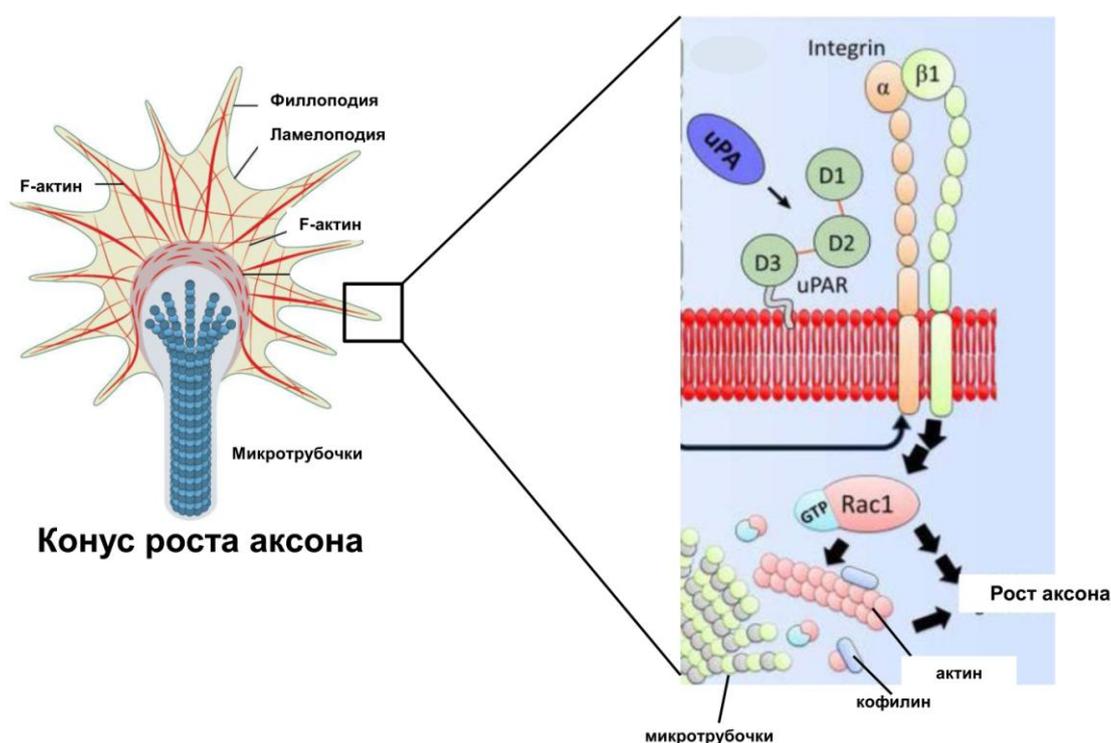


Рис. 3. Организация компонентов цитоскелета (актиновых филаментов и микротрубочек) в конусе роста аксона. Адаптировано из <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-axon-guidance-and-the-growth-cone/>. Микротрубочки и актиновые филаменты показаны схематично. uPA – урокиназа, uPAR – урокиназный рецептор, D1-3 – домены

урокиназного рецептора, Rac1 - малая ГТФаза типа 1, GTP – ГТФ, гуанозинтрифосфат, α β integrin - α и β субъединицы интегринов.

Компоненты базальной мембраны эндоневрия (ламинин, фибронектин) стимулируют рост аксонов, в то время как протеогликаны периневрия (хондроитинсульфатные протеогликаны, миелин-ассоциированный гликопротеин, компонент миелина Nogo), а также фибрин ингибируют [43] [24] [44].

Эндоневральные трубки базальной мембраны также поддерживают пролиферацию и миграцию ШК из проксимального конца нерва. Мигрируя, ШК образуют полосы Бюнгера, в которых клетки связаны между собой за счёт N-кадгериновых контактов [44]. По полосам Бюнгера прорастают регенерирующие аксоны [45]. ШК продуцируют факторы роста, синтезируют компоненты ВКМ, служащие стимулирующим субстратом для роста аксона, а также экспрессируют молекулы клеточной адгезии, такие как интегрины и NCAM-1 [46].

После повреждения происходит активация ШК, которые начинают активно экспрессировать факторы роста. Секретируемые факторы роста привлекают конусы роста аксонов из проксимального участка поврежденного нерва. При этом тип прорастающего аксона определяет фенотип ШК и спектр секретируемых факторов роста. Так для регенерации чувствительных нервов необходимы NGF, BDNF, VEGF, HGF (hepatocyte growth factor), IGF-I (insulin-like growth factor-1), а для двигательных - плеiotрофин (pleiotrophin) и GDNF **GDNF** (glial cell line-derived neurotrophic factor, глиальный фактор роста нервов) [36, 47]. Таким образом, пролиферация ШК необходима не только для фагоцитоза миелиновых оболочек и привлечения макрофагов к месту повреждения, но и для создания перmissive микроокружения для регенерации аксонов.

Для полноценного протекания регенерации взаимодействие между аксонами и ШК должно быть обеспечено в полном объёме и в нужный

момент времени, так отсутствие своевременного контакта может привести к апоптозу нейронов, дегенерации аксонов или патологической иннервации мишеней [48].

По мере роста нейрита ШК вступают с ним в контакт, что, по-видимому, служит сигналом к миелинизации [45]. Взаимодействия между аксонами, ШК и базальной мембраной опосредованы различными молекулами адгезии, относящимися как к молекулам семейства кадгеринов (межклеточные контакты), так и к интегриновым контактам, обеспечивающим адгезию клеток на субстрате [45, 49]. Происходит изменение фенотипа ШК с пролиферирующего на миелинизирующий, характеризующийся повышением экспрессии белков миелиновой оболочки. Мембрана ШК «накручивается» на нейрит и формирует миелиновую оболочку [20, 50, 51].

Возможными механизмами запуска миелинизации является контактная активация ШК нейрегулинами (нейрегулин-1 типа 3 [52]), которые экспрессируют аксоны, либо через снижение экспрессии TGF- β 1 Швановской клеткой (предотвращает возврат ШК в миелинизирующий фенотип [53]).

В случае травмы нерва с полным разрывом, в область разрыва мигрируют фибробласты, продуцирующие компоненты соединительной ткани с формированием рубца [26, 54]. Неорганизованная соединительная ткань рубца нарушает траекторию роста аксонов [54, 55].

Таким образом, для регенерации поврежденных нервов необходим рост аксонов, перестройка их микроокружения и частичное разрушение структур, окружающих нерв (дистальный фрагмент аксона, миелиновый дебрис, ВКМ), а также пролиферация и миграция ШК. Данные процессы определяются взаимодействием между нейронами, клетками глии и компонентами ВКМ.

Лимитирующим регенерацию фактором является способность нейритов проникать через структурно измененный внеклеточный матрикс, окружающие ткани, и клетки, инфильтрирующие зону повреждения, с целью

достичь синаптических мишеней. Эти условия, по-видимому, препятствуют росту аксонов и миграции конусов роста. Конусы роста регенерирующих аксонов секретируют протеазы, в частности активаторы плазминогена (АП), которые разрушают внеклеточный матрикс, адгезивные контакты и высвобождают депонированные во ВКМ факторы роста и цитокины, способствующие полноценной регенерации [7, 8].

Структура урокиназной системы

Активаторы плазминогена урокиназного типа представляют собой семейство сериновых протеаз, состоящих из урокиназы (uPA, активатор плазминогена урокиназного типа), урокиназного рецептора (uPAR, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа) и ингибиторов активатора плазминогена PAI-1 и PAI-2 [13], также известных как серпин 1 и серпин 2 [56, 57]. Впервые урокиназа была выделена в 1947 году из мочи и охарактеризована как фибринолитический фермент, что определило этимологию названия белка; позднее ее обнаружили в плазме крови, семенной жидкости и во ВКМ многих тканей [58, 59]. Рецептор урокиназы uPAR был обнаружен Вассалли в 1985 году [60], а его связь с опухолевыми процессами установлена в 1991 году Оссовским [61]. Активаторы плазминогена синтезируются и секретируются различными клетками: гладкомышечными (ГМК, SMC), эндотелиальными, нейральными, моноцитами/макрофагами, кератиноцитами, эпителиальными клетками, фибробластами и клетками злокачественных опухолей [62].

Урокиназа – сериновая протеаза, с молекулярной массой 50 кДа, секретируется клетками как одноцепочечный зимоген про-uPA (pro-uPA, sc-uPA), неактивный гликопротеин из 411 аминокислот, который после расщепления образует активную двухцепочечную высокомолекулярную форму uPA (HMW uPA, tc-uPA, 32 кДа) [57, 63]. Это превращение катализируется плазмином, фактором свертывания крови XIIa, калликреином, катепсином В, катепсином L, гамма (- γ)-субъединицей

фактора роста нервов (NGF) [57, 64, 65]. При этом ферментативная активность урокиназы возрастает в 300 раз [58, 62, 66]. Активная двухцепочечная форма uPA состоит из N-концевого домена GFD (Growth factor-like domain, домен подобный фактору роста) (аминокислоты 9-45) и имеет высокое сродство к связыванию с рецептором uPAR; крингл-домена (аминокислоты 46-143), участвующего во внутриклеточной передаче сигналов, клеточной адгезии и миграции; С-концевого, каталитически (протеолитически) активного домена (аминокислоты 144-411) [63, 67] (Рис. 4). Каталитический домен обладает высокой специфичностью к плазминогену, основному субстрату uPA, однако способен связываться с некоторыми факторами роста и с ингибитором активатора плазминогена (PAI-1) [68]. Связывание каталитически неактивной sc-uPA с uPAR тоже может индуцировать активацию плазмина. Предполагается, что связывание с uPAR вызывает конформационные изменения в sc-uPA, что делает ее способной активировать плазмин. Следует отметить, что активная форма урокиназы может подвергаться второму этапу протеолиза, в результате которого образуется каталитически активная низкомолекулярная форма uPA и аминоконцевой фрагмент (ATF), состоящий из крингл-домена и GFD [63]. Наличие GFD-домена определяет сходную аффинность про-uPA, двухцепочечной формы uPA и ATF к uPAR [67].

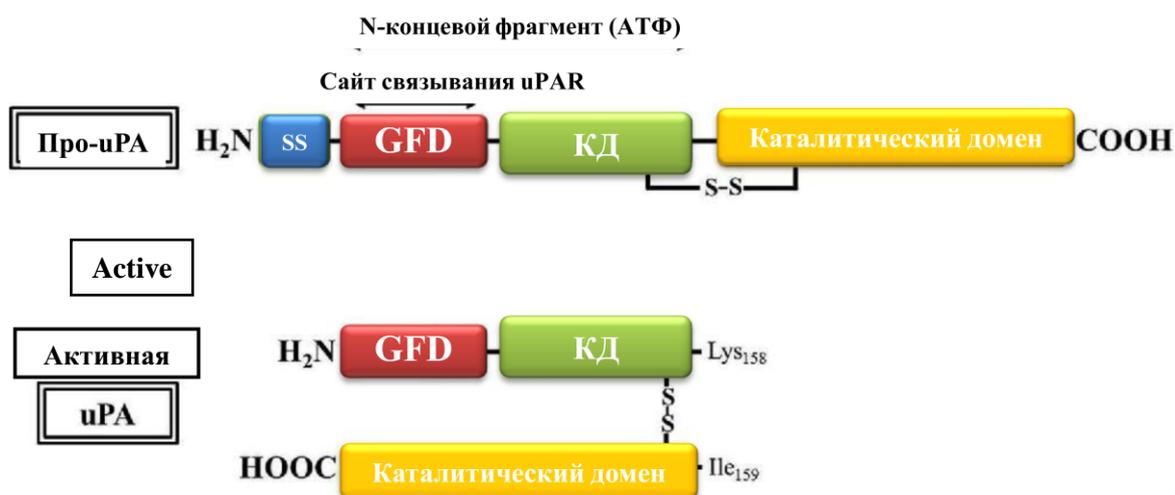


Рис. 4. Структура проурокиназы и урокиназы. GFD - Growth factor-like domain, домен подобный фактору роста, КД - крингл-домен. Адаптировано из Su S.C., Lin C.W., Yang W.E. et al. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets* 20(5), 551-566 - 2016

Рецептор урокиназы (uPAR) имеет высокое сродство к урокиназе (1 нМ) и представляет собой гликопротеин, состоящий из 335 аминокислот, относящийся к семейству антигена лимфоцитов 6 (Ly6/uPAR), члены которого объединены наличием трехпальцевых доменов (LU-доменов) [12]. С N- до С-конца uPAR состоит из трех LU-доменов DI, DII, DIII (Рис. 5), которые соединяются двумя короткими линкерными последовательностями [15]. Линкерные области расположены между доменами I и II (линкер-1) и доменами II и III (линкер-2). Внеклеточные домены uPAR образуют глобулярную структуру, имеющую большую поверхность для латеральных взаимодействий с другими белками с внешней стороны мембраны [69] и образуют карман из D1 и D2 доменов, который является сайтом связывания урокиназы [69, 70]. Так, в домене D1 и линкере D1-D2 располагается сайт для связывания белка ВКМ витронектина [70].

uPAR расположен на внешней стороне плазматической мембраны и не имеет трансмембранного или внутриклеточного доменов. С-конец пептидной цепи uPAR ковалентно связан гликозилфосфатидинозитолом (ГФИ, GPI) и

заякорен на внешнем слое клеточной мембраны [15]. uPAR обладает большой латеральной подвижностью на мембране, что тесно связано с функциональным состоянием клетки. Как и другие GPI-заякоренные белки, uPAR преимущественно локализуется в богатых сфинголипидами и холестерином кластерах плазматической мембраны, т. н. «липидных плотках» [15, 71].

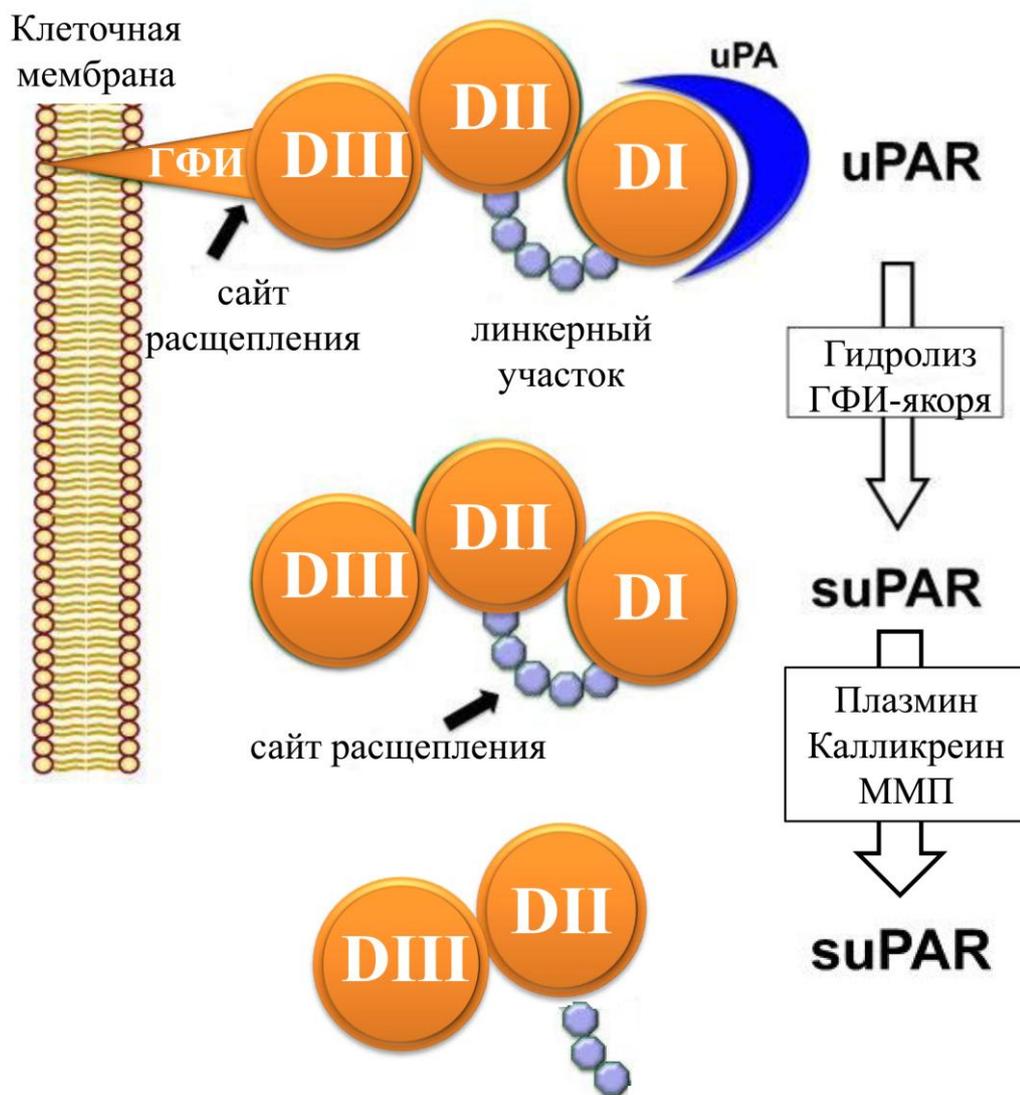


Рис. 5. Структура мембраносвязанного урокиназного рецептора (uPAR) и его растворимых форм (suPAR). DI-III – домены урокиназного рецептора, uPA – урокиназа, ГФИ – гликозилфосфатидилинозитол.

Ингибиторы активаторов плазминогена

PAI-1, PAI-2 принадлежат к суперсемейству серпинов и являются ингибиторами сериновых протеаз. PAI-1 и PAI-2 связываются с uPA в

стехиометрическом соотношении 1:1 и приводят к интернализации комплекса uPA-uPAR-PAI, что обеспечивает регуляцию активности uPA [72]. Этот эндоцитоз обеспечивается несколькими белками: рецептором макроглобулина $\alpha 2$ (LRP), который является мультилигандным рецептором, гомологичным рецептору липопротеинов низкой плотности и участвует в интернализации многих белков; мегалином или гликопротеином 330; а также рецептором липопротеинов очень низкой плотности [13]. В кислой среде эндосом uPA и PAI 1 диссоциируют и деградируют, а uPAR возвращается на поверхность клетки и продолжает функционировать. Экспрессия uPA активируется различными воспалительными факторами: цитокинами, факторами роста и химическими стимуляторами опухолевого роста, такими как форбол-12-миристат-13-ацетат, тогда как противовоспалительные агенты, такие как глюкокортикоиды, ингибируют экспрессию uPA [13]. Регуляция обычно происходит на уровне транскрипции гена и стабильности мРНК, но она также может происходить на уровне трансляции и секреции белка [62].

Протеолитическая активность uPA/uPAR

Урокиназа и ее рецептор активно экспрессируются в условиях, связанных с активацией миграции и пролиферации клеток (репарация, регенерация, воспаление, ангио- и нейрогенез, метастазирование), обеспечивающих эффективный и пространственно ограниченный внеклеточный протеолиз.

При связывании uPA с uPAR происходит расщепление плазминогена до активного плазмина. Плазмин – сериновая протеаза, принимающая участие в ремоделировании тканей [73]. Это протеолитический фермент широкой специфичности, расщепляющий фибриноген до фибрина, факторы свертывания крови V/Va и VIII/VIIIa, некоторые факторы роста, компоненты ВКМ, базальные мембраны и многие матриксные металлопротеиназы (ММП), такие как ММП2, ММП3, ММП9, ММП12 и ММП13, приводя к их

активации [63]. Генерируемый урокиназой плазмин активирует латентный трансформирующий фактор роста-бета (TGF-бета) и изоформы VEGF и способствует высвобождению основного фактора роста фибробластов (bFGF) [73].

Локальное повышение активности протеаз и последующее ускорение внеклеточного протеолиза облегчает миграцию клеток через ВКМ [12, 74, 75]. Протеолитически активная uPA способна расщеплять матриксные белки (фибронектин) и активировать некоторые матриксные металлопротеиназы (ММП 3,6,9,12) и независимо от плазмينا, влиять на ремоделирование внеклеточного матрикса [62, 74]. Также uPA протеолитически активирует фактор роста гепатоцитов (HGF), макрофаго-стимулирующего белка (MSP) и изоформы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF189). В свою очередь uPAR также расщепляется протеолитическими ферментами (урокиназа, плазмин, ММП), что создаёт регуляторную петлю отрицательной обратной связи [12, 73, 76]. Гидролиз ГФИ-якоря (например, под действием фосфолипазы С) приводит к высвобождению растворимых форм uPAR (soluble uPAR, suPAR) [57]. suPAR может влиять на функции мембранно-связанного uPAR, например, связываясь с интегринами или урокиназой и конкурировать за связывание рецептора с последними [77]. Такие формы растворимого uPAR, как фрагмент DII-DIII, образующийся под действием плазмينا, калликреина 4 или металлопротеиназ, могут функционировать как хемоаттрактанты. Например, связываясь с хемокиновыми рецепторами FPRL, suPAR стимулирует хемотаксис базофилов и гладкомышечных клеток [9, 77].

Помимо урокиназы, активировать плазминоген способна другая протеаза – тканевой активатор плазминогена (tPA). Некоторые клетки синтезируют только один тип активатора плазминогена, tPA или uPA, тогда как другие могут синтезировать оба фермента [62]. Основной функцией tPA является инициация фибринолиза, в то время как uPA имеет более широкий спектр функций в организме (такие как стимуляция миграции, пролиферация,

повышение выживаемости и дифференцировки клеток). В отличие от tPA, двухцепочечная uPA активирует одинаково как циркулирующий, так и связанный с фибрином плазминоген [62].

Функции uPA/uPAR не ограничиваются протеолитической активацией плазмина и факторов роста на поверхности клетки. Накопленные данные свидетельствуют о том, что связывание uPA с uPAR на поверхности эндотелиальных клеток, ГМК, эпителиальных клеток и моноцитов активирует сигнализацию, модулирующую миграцию и пролиферацию [37, 78-80] (Рис. 6). Взаимодействие uPA с uPAR на мембране ГМК и эндотелиальных клеток активирует Jak/Stat сигнальный путь. Jak1 образует комплекс с uPA-uPAR на лидирующем крае клетки, что приводит к транслокации факторов транскрипции STAT1 и STAT2 и STAT4 в ядро и к активации транскрипции генов [37, 81, 82]. На нескольких клеточных линиях было показано, что uPA может активировать сигнальные пути, участвующие в реорганизации цитоскелета: Hsk-киназы, киназы фокальных контактов, паксиллин, белок p130CAS, MAP-киназы [83]. Также uPA может регулировать экспрессию генов. Показано, что связывание uPA с uPAR активирует транскрипционные факторы: AP1 в клеточной линии HT-1080 и c-Jun, c-Myc и c-fos факторы в клетках SaOS2 [62, 79, 84].

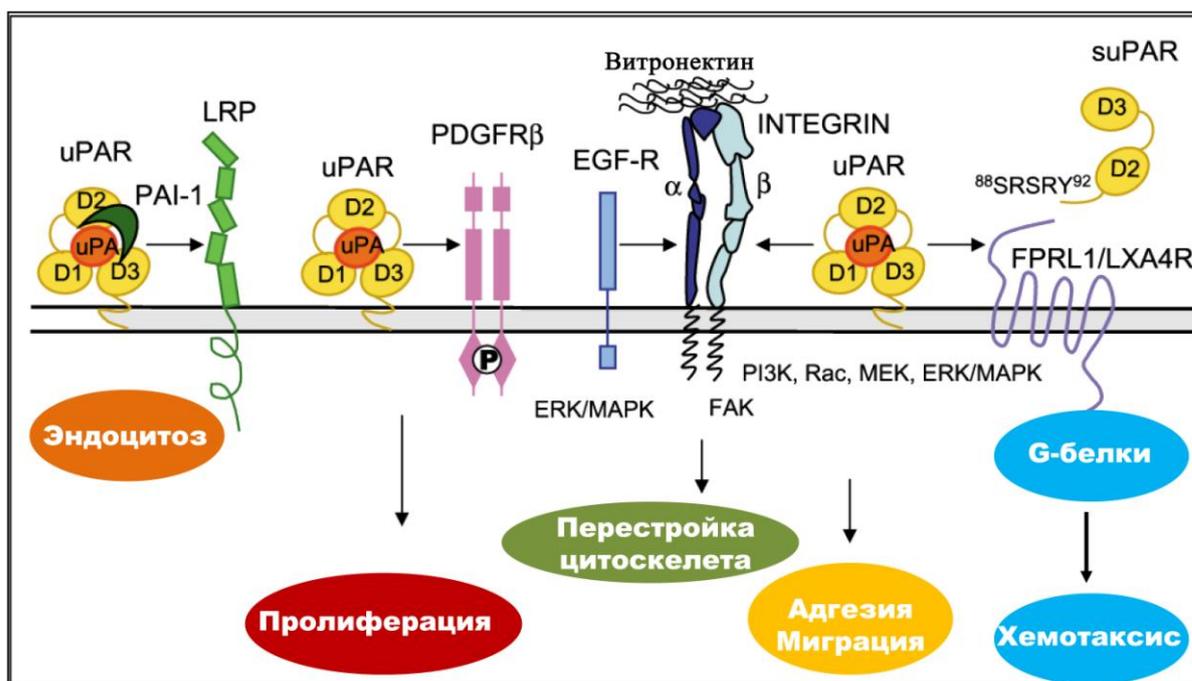


Рис. 6. Взаимодействие компонентов урокиназной системы с латеральными партнерами модулирует внутриклеточную сигнализацию, изменяющую адгезию, миграцию и пролиферацию клеток. (Адаптировано из Binder, Bernd R. et al. “uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view.” *Thrombosis and haemostasis* 97 3 (2007): 336-42 .).

Непротеолитические функции uPA/uPAR

Впервые непротеолитические функции uPA/uPAR были показаны на примере дифференцировки человеческих миелоидных клеток HL60, которая нарушалась при добавлении блокирующих антител к uPA. Было показано, что за данный эффект отвечает ростовой домен uPA, но не протеолитический [85]. Следующим открытием стало то, что связывание аминоконцевого фрагмента uPA (ATF) (протеолитически неактивного) с uPAR стимулировало миграцию человеческих миелоидных и эпителиальных клеток [86]. Кроме того, антитела к uPAR или селективная блокада экспрессии uPAR с использованием антисмысловых олигонуклеотидов также полностью подавляли хемотаксис моноцитов [62, 63].

Для реализации процессов, описанных выше, требуется активация внутриклеточной сигнализации. Отсутствие трансмембранного и цитоплазматического доменов и высокая подвижность на мембране

обуславливает способность uPAR латерально взаимодействовать с трансмембранными рецепторами для передачи сигнала внутрь клеток [15]. Так, было обнаружено, что uPA-индуцируемая миграция моноцитов происходит в результате взаимодействия uPAR с интегринами. Связывание uPA с uPAR стимулирует кластеризацию рецептора урокиназы, повышая его сродство к корецепторам FRPL1, EGFR и интегринам и витронектину, что обеспечивает передачу сигнала внутрь клетки и информацию о ее микроокружении [12].

Интерактом uPAR и его регуляция

С момента открытия uPAR идентифицировано более 40 партнеров урокиназного рецептора и в литературе сообщается о широком спектре взаимодействий uPAR, которые можно разделить на две группы. В первую группу растворимых лигандов входят сериновая протеаза uPA, белок внеклеточного матрикса витронектин (VN), фактор свертывания крови XII, высокомолекулярный кининоген, 2 SRPX2 (sushi repeat protein X-linked). Ко второй группе относятся мембранные белки-партнеры, такие как интегрины, семидоменные G-белок-сопряжённые рецепторы (FPRL1, FPRL2, FPRL3), рецепторные тирозинкиназы (EGFR, PDGFR, IGF-1R), рецепторы эндоцитоза (LRP-1, LRP1B, VLDL-R, LR11, IGF II-R, Endo180), кавеолин 1, цитокиновый рецептор gp130, L-селектин и кератин 1 [15]. В результате этих взаимодействий происходит активация различных сигнальных каскадов, среди которых MAP-киназный сигнальный путь, сигнальный каскад FAK/Src, малая ГТФаза Ras, JAK/STAT и PI3K-сигнальные каскады. Активация перечисленных сигнальных каскадов приводит к изменениям в пролиферации, адгезии и миграции клеток [63, 76].

Взаимодействие uPAR-витронектин

Компонент ВКМ - витронектин является лигандом uPAR и определяет передачу сигнала от uPAR внутриклеточно [76]. Сайт связывания витронектина образован доменом D1 и линкером между D1-D2 доменами.

Места посадки uPA и витронектина на uPAR отличны друг от друга, поэтому урокиназный рецептор может одновременно связываться с обоими лигандами [12]. Связывание uPA повышает сродство uPAR к витронектину путем димеризации и конформационных изменений рецептора [12, 76]. Влияние uPA на миграцию клеток зачастую возможно лишь при одновременном связывании uPAR с витронектином. Прямое взаимодействие между uPAR и витронектином стимулирует образование ламеллоподий и перестройку цитоскелета в мигрирующих клетках. Эти процессы опосредованы $\beta 3$ -интегринами и активацией Ras-сигнального каскада за счёт адапторных молекул p130 и DOCK180 [87]. Блокирование uPAR с помощью антител может полностью подавлять миграцию клеток на витронектиновой матрикс [86, 88]. Способность uPAR связывать компоненты ВКМ позволяет отнести его к классу молекул клеточной адгезии [89]. Клеточная адгезия, опосредуемая uPAR, стимулирует пролиферацию и миграцию клеток на матрикс, богатом витронектином [76].

Взаимодействие uPAR-FPR1

Еще одним из детально изученных латеральных партнёров uPAR является FPR1 [79]. Это рецептор, сопряжённый с G-белками, связывающийся с N-формилированными пептидными лигандами — к примеру, с N-формилметиониллейцилфенилаланином (fMLP) [15]. За связывание с FPR1 и другими рецепторами данного семейства в молекуле uPAR отвечает линкерный участок между доменами D2-D3 [79]. Методом ко-иммунопреципитации было показано прямое взаимодействие uPAR и FPR1 [14]. Связывание uPAR с FPR1 стимулирует миграцию эмбриональных фибробластов мыши NIH-3T3, LB6 клеток и гладкомышечных клеток крысы [90]. При активации внутриклеточной сигнализации от FPR1 из клеточного депо мобилизуется Ca^{2+} и активируются Erk-киназы [79, 86, 90]. На клеточной культуре HEK-293 (эмбриональные клетки почки человека) показано, что применение моноклональных антител против uPAR,

разобщающих взаимодействие uPAR и FPR1, подавляет миграцию клеток на витронектиновом матриксе [91] uPAR и FPR1 образуют комплексы, в состав которых входят и β 1-интегрины [14]. Имеются данные, что посредниками в передаче сигнала от комплексов uPAR-FPR1- β 1-интегрины могут быть малые ГТФазы, такие как Ras1 и Rho, поскольку инактивация сигнальных путей этих ГТФаз в клетках НЕК-293 уменьшает их миграцию только при экспрессии uPAR на поверхности плазматической мембраны [14].

Взаимодействие uPAR-LRP

Одними из партнёров uPAR, являются белки из семейства рецепторов ЛПНП, получившие название LRP (low density lipoprotein receptor-related proteins). Эти трансмембранные рецепторы принимают участие в интернализации (т.е. клатрин-опосредованном эндоцитозе в «окаймлённых ямках» плазмалеммы) многих молекул, расположенных на плазматической мембране. Показано, что интернализация uPAR регулируется за счёт связывания PAI-1 с uPA, а затем с LRP-1 [92]. Комплекс LRP-1/PAI-1/uPA/uPAR интернализуется, далее uPA и PAI-1 разрушаются в лизосомах, а uPAR возвращается на поверхность плазматической мембраны. При взаимодействии uPAR с интегринными комплексами, комплекс uPAR-кавеолин, в который могут входить интегрины, интернализуется по такому же механизму. Это приводит к диссоциации интегринов, дезорганизации сайтов адгезии и прекращению клеточной миграции [93]. Данный механизм эндоцитоза вносит вклад в регуляцию адгезии и миграции. [72, 94]. Отсутствие экспрессии LRP-1 (к примеру, при нокауте его гена) нарушает процесс интернализации и инактивации комплексов uPAR с интегринными комплексами, что приводит к увеличению экспрессии uPAR на поверхности клетки и, как следствие, к усилению миграции клеток [95]. Таким образом, LRP-1 с помощью эндоцитоза регулирует экспрессию uPAR на поверхности клеток [15, 96].

Взаимодействие uPAR-интегрины

Основными трансмембранными рецепторами, обеспечивающими передачу сигнала в клетку через uPAR, являются интегрины [15, 97]. На различных моделях показана взаимная иммунопреципитация и солокализация $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha V5\beta 6$ интегринов с uPAR. Были получены доказательства прямого взаимодействия $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha 3\beta 1$ интегринов с uPAR и найдены участки связывания [10, 98-102]. Среди всех типов интегринов, связывающихся с uPAR, представляют наибольший интерес взаимодействия $\beta 1$ -интегринов с uPAR. uPAR образует комплексы с $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ -интегринами (по данным иммунопреципитации и компьютерному анализу) [98, 99, 103]. Сайт связывания $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов с uPAR располагается в D2-домене uPAR [104], а $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 5\beta 1$ -интегрины взаимодействуют с uPAR в области W4 внеклеточной части α -субъединицы интегрин [99, 105].

Строение интегринов

Интегрины относятся к рецепторным молекулам клеточной адгезии и обеспечивают взаимодействие клеток друг с другом и с ВКМ. Функциональный интегриновый рецептор — это гетеродимер, состоящий из α и β субъединицы [106]. Семейство интегринов состоит из 18 α и 8 β субъединиц, нековалентно взаимодействующих и формирующих 24 варианта уникальных гетеродимеров [107]. Интегрины являются гликопротеидами I типа (С-конец располагается в цитоплазме) [6]. Каждая субъединица интегрин содержит внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматический домены. Внеклеточный домен является бóльшей частью как α , так и β субъединиц интегринов. У α -субъединицы этот домен состоит из β -пропеллера, роторного колена, доменов calf-1 и calf-2; некоторые α -субъединицы (1, 2, 10 и 11) также несут I/A домен в составе β -пропеллера внеклеточной части интегрин [108]. I/A домен α -субъединицы содержит сайты связывания с различными лигандами внеклеточного матрикса, такими

как фибронектин и ламинин. Для взаимодействия интегринов с лигандами необходимы катионы металлов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) [108]. Внеклеточный домен β -субъединицы включает в себя I/A домен, иммуноглобулин-подобный, плексин-семафорин-интегриновый (PSI), β -хвостовой и 4 EGF-подобных домена [108]. Если в α -субъединице какого-либо интегринна отсутствует I/A домен, лиганды связываются с I/A доменом β -субъединицы, образуя комплекс с β -пропеллером α -субъединицы, как это происходит в случае интегринов $\alpha\nu\beta3$ и $\alpha11\beta3$ [106]. Взаимодействие между трансмембранными доменами α и β -субъединиц интегринов определяет общую конформацию рецептора; именно от неё зависит функциональное состояние молекул интегринов и переход из неактивной в активную конформацию (Рис.7).

Функциональная характеристика интегринов

На поверхности цитоплазматической мембраны интегринны могут находиться в активном или неактивном состоянии (Рис. 7). Неактивный интегрин находится в закрытой, или «согнутой», конформации, при которой трансмембранные домены расположены в непосредственной близости, а цитоплазматические — соединены ионным мостиком [106]. Активная конформация интегринов называемая открытой, или «выпрямленной», возникает за счёт удаления трансмембранных и цитоплазматических доменов субъединиц друг от друга и характеризуется повышенной аффинностью к лигандам [6, 106].

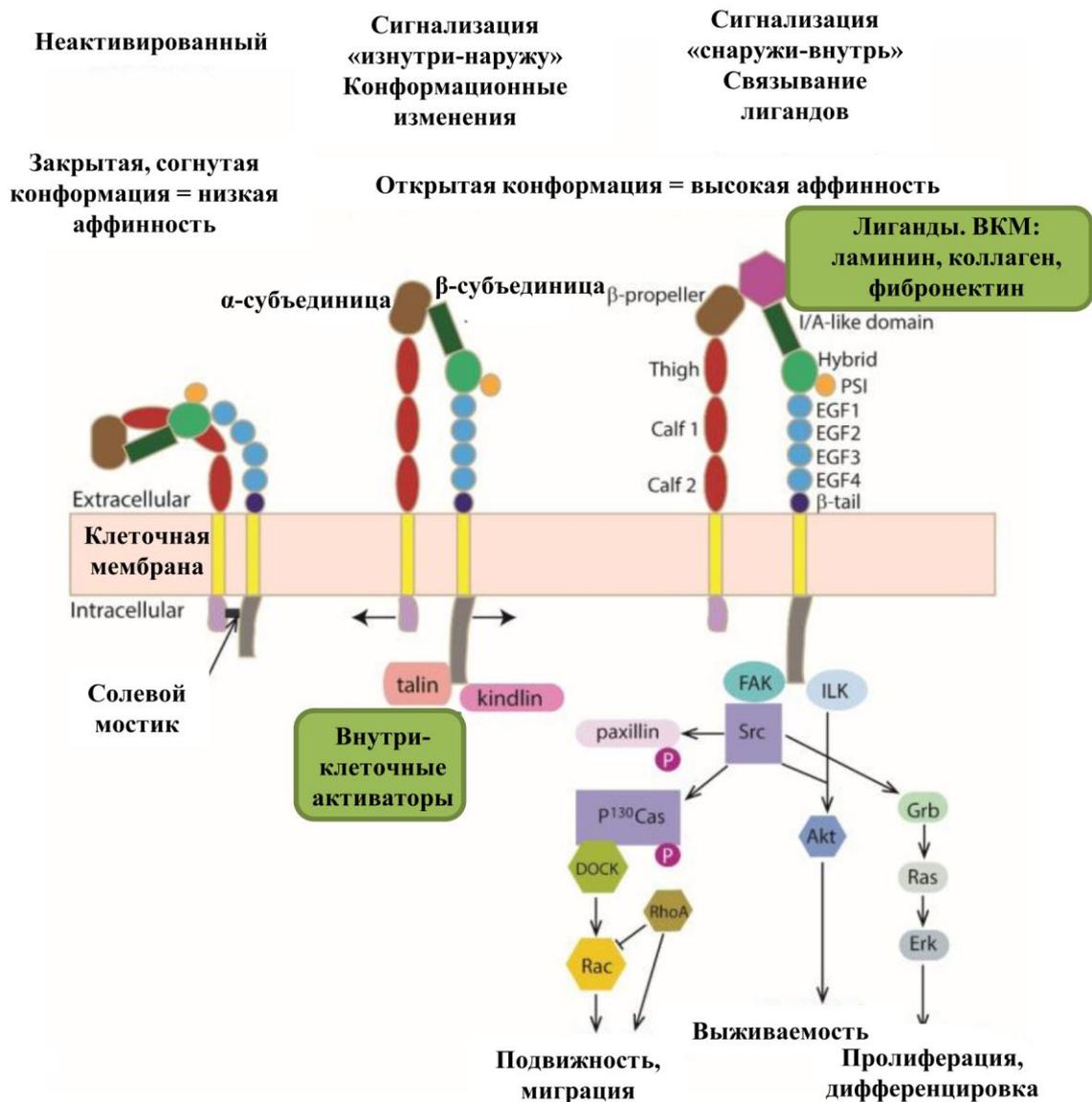


Рис. 7. Общее строение интегринов (адаптировано из David A. Calderwood, D.A., Campbell, I.D., Critchley D.R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14, 503–517, 2013)

Активация интегринов может осуществляться двумя различными способами. В первом, называемом интегриновым сигнальным путём «изнутри-наружу» (inside-out signalling), различные внутриклеточные активаторы интегринов (такие, как киндлины и талины, структурные белки, удерживающие многочисленные интегрин-ассоциированные молекулы и цитоскелет в едином комплексе фокальной адгезии) связываются с

цитоплазматическим доменом β -субъединицы, содержащим NPXY-повторы, дестабилизируют ионный мостик и приводят к «раскрытию» конформации интегрин, что повышает сродство интегрин к лигандам [6, 106].

Активный интегрин с внеклеточным доменом, находящимся в открытой конформации, может специфически связываться с лигандами (компоненты ВКМ) и передавать сигнал внутрь клетки через цитоплазматический домен (сигнальный путь «снаружи-внутри», *outside-in signalling*) [6, 106]. Это приводит к кластеризации рецепторов и формированию комплекса фокальной адгезии, обеспечивающего стабильный контакт клетки с ВКМ.

Различные варианты интегриновых гетеродимеров имеют различную лигандную специфичность; при этом большинство гетеродимеров интегринов может распознавать более одного лиганда, а каждый лиганд – связаться с более чем одним рецептором [109, 110]. Интегрины, в составе которых есть $\beta 1$ или αV -субъединица, связываются с такими белками ВКМ как коллаген, ламинин, фибронектин, витронектин и остеопонтин. $\beta 2$ -интегрины экспрессированы на иммунных клетках и связываются с рецепторами на поверхности других клеток (такими как ICAM). Интегрины, в составе которых есть субъединицы $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 8$, αIIb или αV , распознают последовательность RGD (Арг-Гли-Асп) и связываются с фибронектином и витронектином [109]. Интегрины, содержащие субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ или $\alpha 9$ предпочитают связываться с ламининами; интегрины содержащие субъединицы $\alpha 10$ или $\alpha 11$ – с коллагенами [109].

Цитоплазматический домен интегрин не обладает киназной и фосфатазной активностью, поэтому передача сигнала от рецептора происходит за счёт привлечения киназ или адапторных белков. Во-первых, талин, связанный с цитоплазматическим доменом интегринов, обеспечивает прямое или опосредованное через винкулин взаимодействие с актиновым цитоскелетом, передавая механическое усилие с поверхности клетки на цитоскелет, что важно для прикрепления клеток к ВКМ и согласованности

процессов миграции. Во-вторых, в адгезивный комплекс рекрутируется киназа фокальной адгезии (ФАК), активирующая такие белки, как паксиллин и Src, что в конечном итоге приводит к активации миграции клеток. Интегрин-связанная киназа (ILK), получая сигнал от интегринов, фосфорилирует белки-мишени (Akt-киназу (RAC-альфа серин/треониновая протеинкиназа), GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3), β -катенин, легкие цепи миозина, MAP-киназы), что стимулирует подвижность клеток и внутриклеточный транспорт, изменяет продолжительности фаз клеточного цикла и вызывает подавление апоптоза [6, 107]. (Рис. 7). Интегриновые рецепторы способны привлекать сотни типов белков, формируя комплексы, связывающие их с цитоскелетом. Такие комплексы получили название «интегриновых адгесом» [111]. В результате активации интегринов и их адапторных белков, сигнал может передаваться на митоген-активируемый киназный каскад (МАРК), малые ГТФазы (Rho, Rac), PI3-киназу (фосфоинозитид-3-киназа) и другие. (Рис. 7) Эти сигнальные пути стимулируют пролиферацию, выживание и подвижность клеток. Кроме того, интегрины взаимодействуют со множеством других рецепторов, например с рецепторными тирозинкиназами (такими, как рецептор эпидермального фактора роста) [6, 106].

Эффекты взаимодействия uPAR и интегринов

uPAR солокализуется с интегринными в фокальных контактах и на переднем крае мигрирующих клеток. Было показано, что разобщение взаимодействия uPAR и β 1-интегрина при помощи специфического пептида нарушает адгезию клеток HEK293, ГМК и A1-F клеток (линейные фибробласты кожи человека). При этом uPAR может взаимодействовать как с активной, так и с неактивной формой интегринов [10]. При взаимодействии с неактивной формой интегринов происходит изменение их конформации, т.н. «выпрямление» и переход в активное состояние [112]. Это может быть вызвано ротацией β -субъединицы интегрин, стимулирующей расхождение трансмембранных доменов α и β -субъединиц и передачу сигнала «изнутри-

наружу», [113, 114] что повышает связывание фибронектина с $\alpha 5\beta 1$ -интеринами и ламинина с $\alpha 3\beta 1$ -интегринами [103, 115].

Влияние uPAR-интегринового комплекса на миграцию клеток было продемонстрировано на примере моделях ангиогенеза *in vitro* [96, 104]. Показано, что экзогенно введенный VEGF (эндотелиальный фактор роста) стимулирует образование комплексов uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины на поверхности эндотелиоцитов мыши и человека, локализуя их в сайтах фокальной адгезии на переднем крае мигрирующих клеток [96]. Также было показано, что в культуре CCD-19Lu фибробластов легких человека комплексы uPAR-uPA- $\alpha 5\beta 1$ -интегрин имеют тенденцию к локализации в липидных плотках на мембране мигрирующих клеток. При этом связывание uPAR, uPA и $\alpha 5\beta 1$ -интегрина стимулировало активацию кавеолин-Fyn-Shc сигнального пути и приводило к увеличению миграции фибробластов [116]. Таким образом, солокализация uPAR и интегринов в липидных плотках может изменять механизм передачи сигнала от интегринов и иметь функциональное значение в виде регуляции процессов миграции.

uPAR способен модулировать сигнальные каскады, запускаемые β -интегринами. Так при взаимодействии uPAR с интегринами происходит фосфорилирование FAK, активация MAPK (через Ras и ERK), фосфорилирование Src [12]. При этом тип интегринового гетеродимера определяет специфичность внутриклеточной сигнализации. Например, $\beta 1$ -интегрин регулирует активность FAK и ERK, $\beta 3$ –Rac.[12] Эти сигнальные каскады могут пересекаться: фосфорилирование ERK, опосредуемое $\beta 1$ -интегрином, приводит к дальнейшей активации Rac, активированного сигнальным каскадом, идущим от uPAR- $\beta 3$ -интегрин комплекса [87]. Подавление фосфорилирования FAK и Src, активированного комплексом uPAR- $\beta 1$ -интегрин, блокирует пролиферацию и миграцию фибробластов и препятствует ремоделированию фибронектинового матрикса [117, 118]. В клетках карциномы человека сигнализация, запускаемая uPAR через $\beta 1$ -интегрины, в результате которой активируется ERK и Src, приводит к

повышению экспрессии uPA и матриксной металлопротеиназы-9 за счет активации AP1 транскрипционных факторов [15, 119].

Интегрины, в свою очередь, также влияют на локализацию uPAR. К примеру, взаимодействие uPAR с α M β 2 и α 4 β 1-интегринами приводит к димеризации uPAR, а взаимодействие интегринов α M β 2 и α 3 β 1 с ламинином и фибронектином, соответственно, приводит к перераспределению uPAR в зону фокальных адгезивных контактов [15, 120].

Следует отметить, что урокиназа также может взаимодействовать с комплексом uPAR-интегрины. При помощи *in silico* докинга было показано, что крингл-домен может опосредовать прямое связывание uPA с интегринными. Крингл домен урокиназы может связываться с интегринными как в открытой, так и в закрытой конформации. При этом не происходит непосредственного взаимодействия uPAR с интегринными [121]. На клетках НЕК-293 и нейтрофилах человека было продемонстрировано, что такое взаимодействие имеет физиологическое значение, а именно, образование комплекса uPA- α M β 2-интегрин-uPAR активирует их миграцию [122].

Таким образом, регенерация периферических нервов – комплексный процесс, регулируемый множеством факторов. Взаимодействие аксонов и глиальных клеток с ВКМ, опосредованное молекулами клеточной адгезии, обеспечивает направленный рост периферического нерва. Взаимодействие интегринов с фибронектином и ламинином, компонентами ВКМ, которые являются основными субстратами для миграции ШК и роста нейритов, необходимо для регенерации нервов после повреждения в ПНС. Основными интегринными, ассоциированными с ламинином и фибронектином и стимулирующими регенерацию, являются α 5 β 1, α 4 β 1, α 6 β 1, α 7 β 1. Активация сигнальных путей «изнутри-наружу» и «снаружи-внутри» определяет направление, скорость миграции и пролиферативную активность ШК, направление роста нейритов, и в итоге формирование полноценной

структуры регенерирующего периферического нерва и восстановление функции.

Интегрины регулируют важнейшие сигнальные каскады, обеспечивающие интеграцию клетки с её микроокружением, а специфичность этой сигнализации зависит от адапторных белков, латерально взаимодействующих с ними. Одним из таких белков является рецептор урокиназы, связывающийся с урокиназой и витронектином. В отсутствие uPAR значительно нарушается рост аксонов периферических нервов после повреждения. Отсутствие трансмембранного, и цитоплазматического доменов, обуславливают высокую подвижность uPAR и способность латерально взаимодействовать с другими трансмембранными рецепторами или адаптерными белками. Из литературы известно, что взаимодействуя с $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ интегринными uPAR изменяет конформацию и локализацию интегринов на мембране клеток [123]. В данном взаимодействии могут участвовать рецепторы и адапторные белки (FPR1, LRP1, EGRF), которые совместно с uPAR и $\beta 1$ -интегринными формируют сигнальные комплексы, регулирующие клеточную подвижность, миграцию, выживание, адгезию к субстрату, в том числе и при регенерации нервов в ЦНС.

Урокиназа, взаимодействуя с урокиназным рецептором, оказывает стимулирующее влияние на регенерацию аксонов. В ряде работ показано, что данный эффект опосредуется взаимодействием с $\alpha 5\beta 1$ -интегринными. Однако отсутствуют данные о том, какие механизмы активируются за счет взаимодействия урокиназной системы и интегринов при регенерации периферических нервов. Приведенные выше данные позволяют сделать предположение о том, что взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринными на конусе роста аксонов, взаимная регуляция сигнальных каскадов может играть crucialную роль при регенерации нервов в ЦНС. Более детальное понимание этих молекулярно-биологических и клеточных процессов необходимо как для накопления фундаментальных знаний о

функционировании ПНС, так и для решения задач современной регенеративной медицины и разработки новых подходов к терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антитела и реагенты

В работе использовали следующие первичные антитела: антитела мыши к $\beta 3$ -тубулину (SantaCruz, Sc-51670 RRID:AB_630408), антитела крысы к урокиназному рецептору uPAR (RD Systems, #MAB531), антитела кролика к белку цитоскелета аксонов NF200 (Abcam, ab8135), антитела кролика к $\beta 1$ -интегрину (SantaCruz, Sc-8978), антитела кролика к $\alpha 5$ -интегрину (SantaCruz, Sc-8978), антитела козы к глиальному фибриллярному кислому белку GFAP (Chemicon, #MAB 360), антитела кролика к ядерному маркеру пролиферации Ki67 (Abcam, ab15580), антитела кролика к рецептору fMLP-хемокина FPRL1 (Abcam, ab203129), неспецифические IgG кролика, крысы, козы в качестве контроля (Thermo scientific, #NC-100-P0). Вторичные антитела: антитела козы против иммуноглобулинов кролика, мыши, крысы или антитела осла против иммуноглобулинов козы конъюгированные с Alexa 488 (Invitrogen) или AlexaFluor®594 (Invitrogen). Первичные антитела кролика к виментину (Abcam, ab92547) использовали в Вестерн-блоттинге для контроля загрузки белка. Реагенты и стандарты (Precision Plus Protein 250 кД), используемые для Вестерн-блоттинга, были приобретены у Bio-Rad, буфер для иммунофлюоресцентного окрашивания - у Gibco. Блокирующий пептид $\alpha 325$ и контрольный (бессмысловой) пептид s325 были синтезированы в Лаборатории синтеза пептидов Национального исследовательского медицинского центра кардиологии. В работе использовали растворимые формы урокиназы (uPA, Abcam, ab92641), урокиназного рецептора (suPAR, MYBIOSOURCE, MBS135764), пертуссис токсин (ПТ, Pertussis toxin, Sigmaaldrich, № P7208).

Животные

В экспериментах использовали самцов мышей гибридов дикого типа CBA/C57Bl6 в качестве контроля (WT), нокаутных по гену *PLAU* CBA/C57Bl6 (*uPA*^{-/-}) (получены из C57/Bl6 мышей группой Кармелле, Институт молекулярной онкологии (Милан, Италия) [124], нокаутных по гену *PLAUR* C57Bl6/SV129 (*uPAR*^{-/-}) (получены из C57Bl6/SV129 мышей в Институте биотехнологии Фландрии, Бельгия) в возрасте 4-6 недель. Мышей использовали для изучения восстановления общего малоберцового нерва после травмы. Для анестезии импользовали внутривбрюшинную инъекцию 300 мкл 5% раствора авертина (Sigma). Эксперименты проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS 123) и были утверждены местным этическим комитетом в соответствии с внутренними требованиями Комиссии по биоэтике медицинского факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Все рутинные процедуры, включая содержание животных и уход за ними, проводились в соответствии с пересмотренным Приложением А к ETS 123 (ETS NO.123, 2006 г.).

Модель повреждения периферического нерва

Для оценки влияния урокиназной системы на регенерацию периферического нерва использовали модель пережатия общего малоберцового нерва (*n. Peroneus communis*) [125, 126]. Для повреждения нерва использовали его раздавливание. По классификации Сэддона степень такого повреждения соответствует аксонотмезису [125].

Мышей дикого типа (WT), *uPA*^{-/-} и *uPAR*^{-/-} анестезировали, фиксировали, кожу на левой задней конечности очищали от шерсти и дезинфицировали 70% этиловым спиртом. Кожу вскрывали, раздвигали мышечные волокна задней поверхности бедра и фиксировали металлическими крючками. Общий малоберцовый нерв отделяли от

окружающих тканей и однократно раздавливали на уровне его перехода на латеральную головку икроножной мышцы при помощи пинцета в течение 20 секунд. Для раздавливания нерва использовали глазной пинцет с силиконовыми насадками на браншах с шириной бранш 1 мм Рану промывали стерильным физиологическим раствором [127].

Оценка эффективности регенерации периферического нерва после травмы

Эффективность регенерации *n. Peroneus communis* у мышей дикого типа (WT), uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} оценивали функционально и морфологически. Функциональное восстановление оценивали, используя электрофизиологический метод исследования, морфологическое – по количеству регенерирующих аксонов и пролиферации Шванновских клеток.

Оценка функционального восстановления нерва.

Электрофизиологическое исследование проводили на 7, 14, 21 день после повреждения и оценивали восстановление проводимости. Животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков, фиксировали на операционном столике, на прооперированной конечности вскрывали кожу, удаляли мышцы и изолировали общий малоберцовый нерв при помощи ножниц. В момент выделения нерва его поверхность смачивали раствором Лайли для теплокровных (135,0 мМ NaCl, 4,0 мМ KCl, 2,2 мМ CaCl₂, 1,0 мМ MgCl₂, 0,9 мМ NaH₂PO₄, 16,3 мМ NaHCO₃, 11,0 мМ D-глюкозы, pH 7,2-7,4). Выделенный нерв длиной около 2 см помещали в раствор Лайли.

Стимуляцию нерва проводили в электрофизиологической камере с раствором Лайли на 7–8 мм проксимальнее места повреждения с использованием пары серебряных электродов (дистанция между электродами составляла 1,5 мм) (Рис. 8). Стимуляцию проводили с частотой импульса 1 Гц, продолжительность импульса 0,05 мс и супрамаксимальная амплитуда 10 В. Промежуток времени от забоя животного до момента регистрации

вызванных потенциалов действия был стандартным: 35-45 минут. СПДН регистрировали 3 раза для каждого нерва монополярным аспирирующим электродом, который располагали на 10 мм дистальнее места повреждения. Регистрирующий электрод был связан с усилителем, АЦП E14-140 (L-card) и персональным компьютером. Регистрацию и анализ данных осуществляли с помощью программы PowerGraph Professional 3.3 [127].

Регистрируемые СПДН характеризуется двумя параметрами, латентным периодом и амплитудой. Латентный период - это время от момента стимуляции нерва до момента регистрации вызванного потенциала действия, измеряемое в миллисекундах. Латентный период характеризует скорость проведения возбуждения по нерву, причем его величина обратно пропорциональна скорости проведения возбуждения по нерву. Таким образом, увеличение латентного периода после повреждения свидетельствует о снижении скорости проведения вызванных потенциалов по поврежденному нерву. Поскольку скорость проведения вызванных потенциалов действия по нерву определяется качеством миелиновой оболочки нервных волокон, то укорочение латентного периода свидетельствует о лучшем ее восстановлении [127, 128].

Амплитуда характеризует количество нервных волокон, участвующих в проведении возбуждения, измеряется в милливольтгах (мВ). Чем меньше амплитуда СПДН, тем меньшее количество нервных волокон содержит поврежденный нерв [125, 127, 128].



Рис. 8. Схема стимуляции нерва и регистрации суммарных потенциалов действия.

Получение криосрезов нервов

Для получения продольных и поперечных криосрезов интактных нервов или поврежденных нервов на 4, 7, 14, 21 день после травмы животных забивали, изолировали нервы *n. Peroneus communis* и фиксировали 4% раствором формальдегида на PBS в течение 3 часов. Отмывали 3 часа в PBS и замораживали в среде Tissue-Tek (Sakura Finetek) погружая в жидкий азот. Получали срезы толщиной 6 мкм. Поперечные криосрезы готовили из участка нерва, расположенного на 2 мм дистальнее места повреждения.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для иммунофлуоресцентного окрашивания образцы тканей или клетки отмывали в PBS 10 минут. При необходимости фиксировали в 4% растворе формальдегида (Sigma-Aldrich, 50-00-0), приготовленного на буфере PBS (pH 7,0) в течение 10 минут. Далее отмывали в PBS 3 раза по 10 минут. При необходимости повышения проницаемости (пермеабилитации) мембран использовали 0,1% раствор TritonX-100, приготовленный на PBS. Чтобы блокировать неспецифическое связывание, образцы обрабатывали 10% раствором нормальной сыворотки осла или козы (Sigmaaldrich) в течение 1 часа. Первичные и вторичные антитела разводили в соответствии с указаниями производителя в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА, BSA). Наносили первичные антитела и инкубировали во влажной камере при 4°C ночь. Затем отмывали в PBS 3 раза по 10 минут и

наносили вторичные антитела. Инкубировали в темноте во влажной камере в течение 45 минут. Отмывали в PBS 3 раза по 10 минут и наносили 300 мМ раствор 4-,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) для визуализации ядер (Invitrogen, 1:10000). Инкубировали в течение 10 минут и снова отмывали в PBS 3 раза по 10 минут. Удаляли со срезов избыточную жидкость и заключали в нефлюоресцирующую среду Aqua Poly Mount (Polysciences).

Конфокальная микроскопия

Съемку полученных препаратов осуществляли с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии Zeiss (LSM 780) с программным обеспечением ZEN 2010 и Leica (TCS SP5) (Germany) при комнатной температуре. DAPI, AlexaFluor®488 и AlexaFluor®594 последовательно возбуждали с использованием лазеров с длиной волны 405 и 488, 594, соответственно. Все изображения были получены при одинаковых настройках микроскопа. Интенсивность флуоресценции оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ (Национальный институт здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США), вычитали среднее значение интенсивности фона и нормировали на площадь объекта. Анализ солокализации был выполнен с использованием плагина Coloc2 для программного обеспечения ImageJ. Коэффициенты солокализации M1 и M2 представляют собой два разных параметра и отражают процент от общего сигнала, который солокализуется с каждым из двух иммунофлуоресцентных сигналов. В настоящей работе коэффициент M1 обозначал долю сигнала флуоресценции uPAR, перекрывающегося с флуоресценцией сигнала интегринов, а M2 - долю сигнала флуоресценции интегринов, перекрывающихся с флуоресценцией сигнала uPAR (Manders et al., 1993). Изображения были обработаны в программе Photoshop (версия CS5, Adobe) или ImageJ и представлены как наложения зеленого, красного и синего цветов.

Выделение спинальных ганглиев мыши

Для выделения спинальных ганглиев (СГ) мышей дикого типа (WT), uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} летально анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 300 мкл 5% раствора авертина и декапитировали. Далее спускали кровь, фиксировали животное на операционном столике, дезинфицировали 70 % раствором этанола, вскрывали кожу и удаляли мышцы. После вскрытия позвоночника и удаления спинного мозга выделяли СГ в асептических условиях, используя стереомикроскоп Olympus SZ Stereo. Выделенные СГ помещали в боросиликатные камеры в каплю Матригеля (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix). Матригель представляет собой солюбилизованный препарат базальной мембраны клеток саркомы мыши и содержит белки внеклеточного матрикса, такие как ламинин (основной компонент), коллаген IV, гепарансульфат и протеогликаны. После полимеризации Матригеля добавляли укомплектованную среду DMEM (Hyclone) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1X незаменимых аминокислот и 1X раствор антибиотика-антимикотика (Gibco). В зависимости от эксперимента СГ культивировали в течение 7-14 суток в стерильном влажном инкубаторе при 37 °С и при 5 % концентрации CO₂. Анализ роста аксонов проводился с использованием плагина NeuronJ для программы ImageJ.

Выделение первичной культуры нейронов из спинальных ганглиев мыши.

Перед выделением нейронов 12 мм круглые стеклянные предметные стекла (cover slips) (72196-112, EMS) покрывали L-полилизинном в концентрации 10 мкг/мл (Ф069, Панэко) и инкубировали при 37 °С в течение часа. L-полилизин растворяли в фосфатно-солевом буфере. В стерильных условиях выделяли СГ мышей дикого типа (WT) как описано выше. Выделенные СГ помещали в 1 мг/мл раствор коллагеназы (Collagenase type I, 285 U/mg, 17100-017, Gibco), приготовленный на буфере Хэнкса.

Инкубировали 90 минут при $t=37^{\circ}\text{C}$, встряхивая эппендорф каждые 30 минут. Далее лизат ткани гомогенизировали инсулиновым шприцем и центрифугировали 10 минут на скорости 2000 об/мин, удаляли раствор коллагеназы и добавляли 1 мл укомплектованной среды DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), 10% ФБС, 1X незаменимых аминокислот и 1X раствор антибиотика-антимикотика (Gibco). Пипетировали и наносили на стекла, покрытые L-полилизинном. Оставляли на ночь в инкубаторе до полной адгезии клеток.

Клеточные культуры

Клетки нейробластомы мыши Neuro 2A (N2A) (ATCC Cat# CCL-131, RRID:CVCL_0470) ATCC® CCL-131tm и клетки эмбриональных почек человека HEK-293.2sus (ATCC® CRL-1573.3tm) культивировали в укомплектованной среде DMEM при 37°C и 5% CO_2 . В экспериментах использовали клетки до 20-го пассажа после разморозки. Нейритогенез в клетках Neuro2A индуцировали 24-часовым культивированием в среде DMEM, содержащей 1% ФБС (сывороточная депривация). Через 1-3 дня клетки N2A клетки использовали для экспериментов.

Подавление и гиперэкспрессия uPAR в клетках Neuro2A

Для изменения экспрессии uPAR клетки N2A в концентрации 10^4 /мл высаживали на 6-луночный планшет и культивировали до достижения 70% монослоя в укомплектованной среде DMEM. Далее сменяли среду на бессывороточную и проводили трансфекцию с использованием Lipofectamine 2000 (11668027, ThermoFisher). Для трансфекции использовали 2 мкг плазмиды, кодирующей sh-uPAR (uPAR shRNA Plasmid, Santa Cruz, Cat# sc-36782-SH) или 2 мкг плазмиды pN1-uPAR [129] для получения клонов с подавленной экспрессией uPAR или гиперэкспрессирующих рецептор, соответственно. Через 5 часов сменяли среду на укомплектованную. Полученные клетки с подавленной экспрессией культивировали в

укомплектованной среде, содержащей антибиотик пурамицин в конечной концентрации 2 мкг/мл, клетки с гиперэкспрессией uPAR культивировали с добавлением антибиотика G418 в концентрации 200 мкг/мл. Оценку экспрессии uPAR проводили методом ПЦР в реальном времени и методом Вестерн-блоттинга и сравнивали с контрольными клетками N2A, трансфицированными контрольными плазмидами. Для ПЦР использовали пару праймеров: прямой 5'-CGCCACAAACCTCTGCAAC-3', обратный 5'-CTCTGTAGGATAGCGGCATTG-3'. Программа денатурации, отжиг праймеров uPAR и β -актина и удлинение праймеров: 94 °C в течение 15 секунд, 62 °C в течение 15 секунд и 72 °C в течение 20 секунд, 40 циклов соответственно. Относительный уровень транскрипта uPAR рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta t}$.

Получение клеток нейробластомы мыши N2A с подавленной экспрессией uPAR методом CRISPR/CAS9.

Клетки N2A с подавленной экспрессией uPAR были получены при помощи технологии CRISPR/CAS9. Для снижения экспрессии гена PLAUR были отобраны и проанализировали последовательности направляющих РНК, встроенные в плазмиды pX458nickase-sg1 и pX458nickase-sg2 (D10A), кодирующие эндонуклеазу Cas9 и ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Ген EGFP был использован для селекции клеток [130].

Для направления Cas9 в область первого экзона гена uPAR была подобрана пара sgRNA с помощью онлайн-сервиса CRISPR/Cas9-MIT. В работе использованы последовательности олигонуклеотидов: backbone primer (праймер, комплементарный вектору pX458nickase) 5' CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC 3'; sg1 (sgRNA1 к 5'-UTR участку гена uPAR) 5' CACCGCTGCTCTAGACTGACCGAG 3'; sg1c (последовательность, комплементарная sg1-1) 5' AAACCTCGGTCAGTCTAGAGCAGC 3'; sg2 (sgRNA2 к 1 экзону гена uPAR)

5' CACCGACCCATGGGACTCCCAAGG 3'; sg2c (последовательность, комплементарная sgRNA2 к sg2) 5' AAACCCTTGGGAGTCCCATGGGTC 3'.

Для трансфекции использовали Lipofectamine2000 (Cat #11668030, Thermo Fisher Scientific); трансфекцию проводили согласно протоколу производителя. Для более эффективного подавления экспрессии uPAR проводили три последовательных цикла ко-трансфекции плазмидами pX458nickase-sg1 и pX458nickase-sg2. Далее клетки сортировали на клеточном сортере (BD FACS Aria III) с использованием лазера с длиной волны 488 нм для отбора EGFP-позитивных клеток; результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения BD FACS Diva [130]. Для оценки степени снижения экспрессии uPAR был проведен анализ его содержания в мембране клеток методом Вестерн-блоттинга.

Фракционирование клеточных лизатов

Цитозольную, мембранную и ядерную фракции получали с использованием коммерческого набора Qproteome™ Cell Compartment kit в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen). Лизаты клеток разделяли на фракции с помощью экстракционного буфера для цитоплазматических и мембранных белков. Концентрацию белков в каждой фракции определяли с использованием коммерческого набора BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford). Анализ образцов осуществляли методом Вестерн-блоттинга.

Метод Вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга)

Получение лизатов клеток

Все процедуры проводили на льду. Последовательно аспирировали культуральную среду с чашек Петри, затем промывали клетки PBS 1 раз 5 мин, далее лизировали в буфере Леммли (Laemli, BioRad), добавляя ингибиторы протеиназ (PIERCE) 1:100. Образцы инкубировали 10 мин, периодически пипетируя. Далее собирали клеточный лизат и переносили в 1,5 мл эпендорфы, после чего кипятили 10 минут при 90°C и замораживали.

Концентрацию белка в полученном лизате определяли колориметрическим методом по реакции с бичинхониновой кислотой (2,2'-бихинолин-4,4'-дикарбоновая кислота) с использованием БСА в качестве стандарта (Pierce).

Определение концентрации белка в лизатах клеток

Концентрацию белка в лизатах определяли колориметрическим методом по реакции с бичинхониновой кислотой (Bicinchoninic acid protein assay kit, Pierce) в соответствии с инструкцией производителя. Лизаты клеток предварительно центрифугировали 10 мин при скорости 3000 об/мин. После чего на 5 мкл пробы добавляли 1 мл реагента, хорошо перемешивали и инкубировали 10 минут при 65 °С. Далее определяли концентрацию белка на спектрофотометре при длине волны 562 нм. В качестве стандарта использовали коммерческий БСА (Pierce) с концентрацией 0,5 - 2 мкг/мл.

Вестерн блоттинг

Лизаты клеток смешивали с буфером Леммли (Laemmli) для выравнивания концентрации и инкубировали 10 минут при температуре +90⁰С. Образцы разделяли в полиакриламидном геле SDS-PAGE в денатурирующих условиях. Процент геля выбирали в зависимости от молекулярных масс исследуемых белков (плотность геля в экспериментах составляла 7,5%-14%). После этого осуществляли электроблоттинг образцов с геля на PVDF мембрану (Immobilon, Millipore) в течение 30 минут при напряженности поля 25 V. Далее промывали мембраны в трис-буферном солевом растворе (TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Трис / HCl, pH 7,4) 3 раза по 10 минут. Для блокирования неспецифического связывания вторичных антител мембраны инкубировали в течение 120 минут в блокирующем буфере, содержащем 5% обезжиренного молока, 0.5% детергента Tween20 в PBS, далее последовательно наносили раствор первичных и вторичных антител в разведении 1:1000 и 1:3000, соответственно. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение ночи при +4⁰С., со вторичными - в течение 45 мин при комнатной температуре. Мембраны промывали в TBS, содержащем 0,5% Tween 20 3 раза по 10 мин.

Визуализацию окрашивания проводили хемилюминесцентным методом (SuperSignal WestPico, Thermo Scientific) с использованием высокочувствительной системы детекции ChemiDoc (Bio-Rad). Для контроля загрузки белка использовали окрашивание антителами кролика к виментину (Abcam, ab92547).

Эксперимент по разобщению взаимодействия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ интегринов в культуре клеток N2A

Для оценки роли взаимодействия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в формировании нейритов, использовали блокирующий пептид $\alpha 325$, разобщающий взаимодействие uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов, но не влияющий на функционирование интегринов [131]. В качестве контроля использовали бессмысловый пептид s325. Клетки N2A с различной экспрессией uPAR высаживали на 48-луночный планшет, покрытый фибронектином в концентрации 0,5 мкг/мл, или на непокрытый пластик, в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток/лунка в 0,5 мл укомплектованной среды DMEM. Через 24 часа переводили клетки на среду DMEM, содержащую 1% ФБС, добавляя контрольный s325 или блокирующий $\alpha 325$ пептиды в концентрации 100 нМ, или урокиназу в концентрации 10 нМ. Через 72 часа оценивали количество клеток, сформировавших нейриты, с использованием фазово-контрастного светового микроскопа (Axiovert 2000, Zeiss Ltd.) с 20 \times объективом. Отросток считали нейритом, если его длина превышала диаметр тела клетки в два и более раз. Анализ проводился с использованием плагина NeuronJ для программы ImageJ. Клетки подсчитывали в 6 лунках в 3 случайно выбранных полях зрения. Представлены результаты как минимум трех независимых экспериментов.

Синтез пептидов

Синтез гептадекапептидов α -325 и s-325 проводили с C-конца с применением Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил) методологии. Для

блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот применяли следующие защиты: *трет*-бутильную (Bu^t) - для гидроксильной функции серина и карбоксильной функции глутаминовой кислоты, тритильную (Trt) – для имидазольной функции гистидина и амидной функции глутамина, 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильную (Pbf) – для гуанидиновой функции аргинина. Для деблокирования α-аминогрупп использовали раствор, содержащий 10% 4-метилпиперидина (4-MePip) и 2% 1,8 –диазабицикло[5.4.0]-ундец-7-ена (DBU) в N,N'-диметилформамиде (DMF). В качестве конденсирующего агента использовали N,N,N',N'-тетраметил-O-(бензотриазол-1-ил)урониятетрафторборат (TBTU) и N-метилморфолин (NMM). Отщепление и деблокирование тетрадекапептидов осуществляли действием трифторуксусной кислоты (TFA) со специальными добавками, предотвращающими побочные реакции, и очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) до 97-98% чистоты.

Структуру пептидов подтверждали данными ¹H-ЯМР-спектроскопии. ¹H-ЯМР-спектры снимали на спектрометре WH-500 Bruker 500МГц (ФРГ) в дейтерированном диметилсульфоксиде (DMSO-*d*₆) при 300К, концентрация пептидов составляла 2-3 мг/мл, химические сдвиги измерялись относительно тетраметилсилана. Масс-спектры регистрировали на приборе Ultraflex MALDI/TOF BrukerDaltonics (ФРГ).

В работе были использованы производные L-аминокислот фирмы Vachem и Fluka (Швейцария), реагенты: DBU, 4-метилпиперидин, NMM, TBTU, TFA и триизобутилсилан (TIBS) и растворители: дихлорметан (DCM), DMF, N-метилпирролидон (NMP) фирмы Fluka (Швейцария).

Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы Panreac (Испания). Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Kromasil ODS (4.6x250 мм,

размер частиц сорбента - 5 мкм) на хроматографе фирмы Knauer (Германия). Детекцию пептидов осуществляли при длине волны 220 нм. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизировали.

Пептид (**α -325**) был синтезирован автоматическим твердофазным методом на полимере Ванга, представляющем собой сополимер стирола и 1% дивинилбензола, с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группировкой (NovaBioChem, Швейцария), предназначенном для получения амидов пептидов. Синтез проводили автоматическим методом с использованием Fmoc-производных аминокислот на пептидном синтезаторе Tribute-UV (ProteinTechnologies, Inc., США), исходя из 0.21 г (0.125 ммоль), Fmoc-Gly-полимера со степенью замещения стартовой аминокислотой – 0,60 ммоль/г. Использовался стандартный протокол автоматического синтезатора для однократной конденсации 4-кратного избытка Fmoc-аминокислоты (Fmoc-AA) по отношению к содержанию аминогрупп в полимере методом TBTU/NMM.

Пептид (**α -325**) очищали с помощью препаративной ВЭЖХ в указанных выше условиях. Выход целевого пептида (**α -325**) составил 0.035 г (14.5% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру), чистота - 97.7%, $R_t = 18.28$ мин. Н-ЯМР – спектрометрия показала корректный аминокислотный состав.

Контрольный пептид **s-325** был получен и очищен в тех же условиях, исходя из 0.17 г (0.125 ммоль) Fmoc-Leu-полимера со степенью замещения стартовой аминокислотой – 0.67 ммоль/г. Содержание целевого пептида в «сыром» продукте ТФС – 60% (по данным аналитической ВЭЖХ). Выход пептида -40 мг, чистота - 97.5%. $R_t = 17.07$ мин. Н-ЯМР – спектрометрия показала корректный аминокислотный состав.

Реакция ко-иммунопреципитации.

Контрольные клетки N2A (WT) и клетки с гиперэкспрессией uPAR (uPAR \uparrow) высевали на 6-луночные планшеты и культивировали до достижения монослоя. Далее в среду культивирования DMEM добавляли пептиды α 325 или s325 (100 нМ) и инкубировали 20 минут. После этого клетки лизировали на льду, используя буфер RIPA (25 мМ Трис • HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS), содержащий ингибиторы протеаз (Cell Signaling, Cat# 5871). Ко-иммунопреципитацию проводили с использованием набора для иммунопреципитации Dynabeads™ Protein G (Thermo Fisher Scientific, Cat# 10003D) в соответствии с протоколом производителя. Антитела против α 5-интегрина или IgG в качестве контроля инкубировали с магнитными бусами Dynabeads, покрытыми G белком, в течение 10 минут. Избыток антител отмывали, помещая пробирки в магнит DynaMag™ (Thermo Fisher Scientific, Cat# 12321D) и удаляя супернатант. Магнитные бусы, покрытые антителами против α 5-интегрина, добавляли к тотальным клеточным лизатам, содержащим 200 мкг общего белка. Инкубировали в течение 1 часа, трижды промывали буфером PBS. Иммунопреципитированные белки элюировали путем кипячения в течение 10 минут в буфере SDS/PAGE и анализировали с помощью метода Вестерн-блоттинга.

Статистический анализ

Данные анализировали с использованием программного обеспечения SigmaPlot11.0 и RStudio. Нормальность всех данных анализировали с помощью теста Шапиро-Уилка или Колмогорова-Смирнова. Гомогенность групповых дисперсий проверяли по критерию Бартлетта. Для межгрупповых сравнений данные с нормальным распределением анализировали с использованием ANOVA с критерием Тьюки. В других случаях применялся тест Крускала-Уоллиса с последующим тестом Крускала-Немени или ANOVA on Ranks. Т-тест

применялся для сравнения двух групп, если данные были нормально распределены. В других случаях использовали тест Манна-Уитни. Нормально распределенные данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. В остальных случаях данные представлены в виде медианы и процентилей (25%, 75%). Статистически значимым различие считали при $p < 0,05$, n - количество повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ*

Ингибирование uPA и uPAR снижает рост аксонов из эксплантов спинальных ганглиев в Матригель.

Чтобы оценить влияние uPA и uPAR на рост аксонов мы использовали описанную нами ранее трехмерную эксплантную модель спинального ганглия (СГ) мыши в Матригеле *ex vivo* [132, 133]. В эксперименте использовали СГ мышей дикого типа WT, которые после выделения помещали в каплю Матригеля. До полимеризации в Матригель добавляли специфический ингибитор uPA (гидробромид ВС 11) для селективного подавления эндогенной uPA или антитела к uPAR, блокирующие связывание uPA с uPAR, или оба блокирующих агента для полного ингибирования системы uPA/uPAR. На 14 сутки СГ окрашивали антителами к NF200, распознающими аксоны, и анализировали длину аксонов, прорастающих из эксплантов в Матригель, с использованием сканирующего конфокального микроскопа. Мы обнаружили, что подавление эндогенной урокиназы приводило к уменьшению длины аксонов (Рис. 9). Блокирование же uPAR антителами приводило к изменению нормальной траектории роста аксонов и увеличению ветвления. Совместное введение ингибиторов uPA и uPAR практически полностью подавляло прорастание аксонов из СГ в Матригель. Таким образом, мы обнаружили, что uPA может регулировать рост аксонов, в то время как uPAR важен для регуляции направленного роста аксонов и их ветвления.

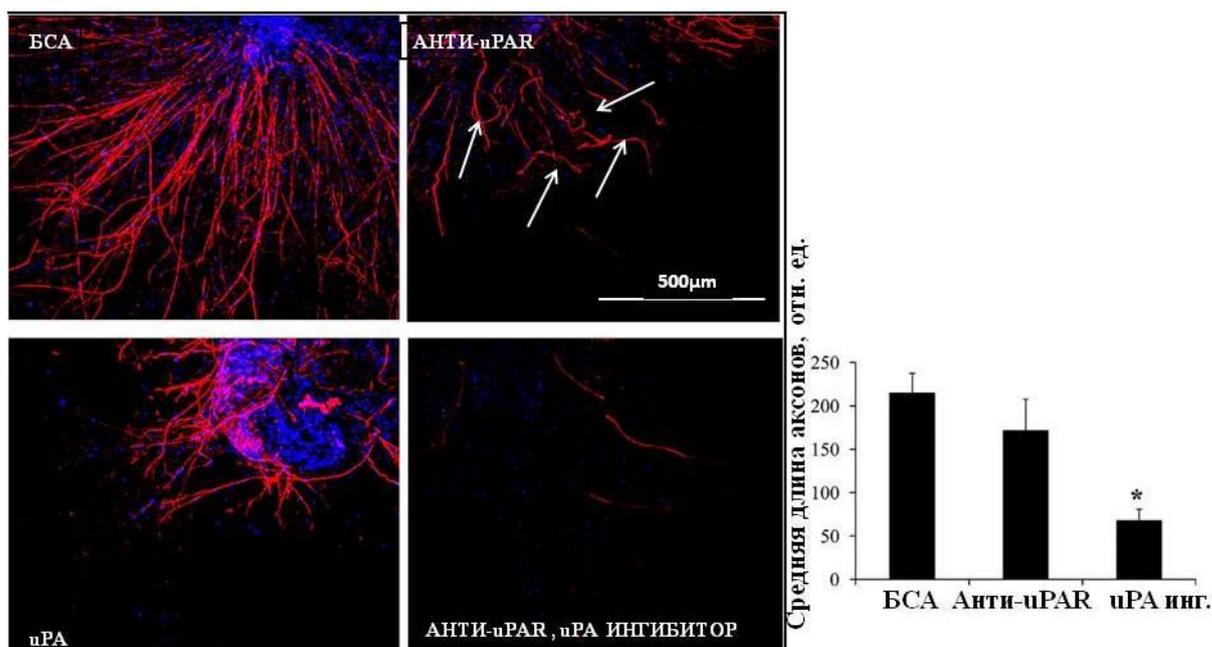


Рис. 9. Иммунофлуоресцентное окрашивание СГ в Матригеле антителами к NF200 (красная флуоресценция) на 14 сутки культивирования. Ядра окрашены DAPI. Стрелки указывают на изменение траектории роста. На диаграмме представлен подсчет средней длины аксонов, прорастающих из СГ в Матригель. $n = 6$, $p < 0,05$, Т-тест.

Нокаут uPA приводит к увеличению площади, занимаемой отрастающими от спинальных ганглиев нейритами.

Далее мы использовали СГ контрольных мышей дикого типа (WT) и мышей, нокаутных по гену урокиназы (uPA^{-/-}) или урокиназного рецептора (uPAR^{-/-}). СГ высаживали в каплю Матригеля и на 7 день оценивали относительную площадь: считали общую площадь, занимаемую отрастающими от ганглия нейритами, нормируя ее на площадь тела СГ.

Мы обнаружили, что относительная площадь отрастающих нейритов из СГ в Матригель у uPA^{-/-} мышей была достоверно больше, чем у WT мышей (uPA^{-/-} $19,5 \pm 8,2$ отн. ед; WT $9,32 \pm 2,6$ отн. ед, $p=0,01$) (Рис. 10). Разницы в площади отрастающих нейритов СГ от uPAR^{-/-} мышей по сравнению с WT мышами не наблюдалось (uPAR^{-/-} $10,4 \pm 3,1$ отн. ед; WT $9,32 \pm 2,6$ отн. ед, $p>0,05$). Ранее нами было показано, что в СГ у uPA^{-/-} мышей экспрессия

uPAR повышена [129]. Возможно, именно гиперэкспрессия uPAR стимулирует рост нейритов в отсутствие урокиназы [133].

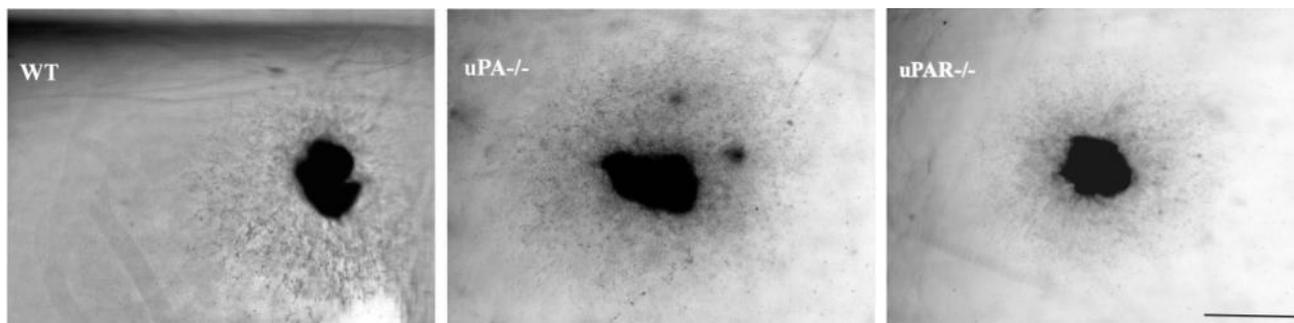


Рис. 10. Представлены спинальные ганглии WT и uPA^{-/-}, uPAR^{-/-} мышей, помещенные в каплю Матригеля. Масштабный отрезок 500 мкм.

Модель спинального ганглия в Матригеле является моделью регенерации аксонов (или нейритов). Так как мы обнаружили влияние компонентов урокиназной системы на рост аксонов и нейритов, далее мы оценивали роль урокиназной системы в регенерации нервов.

Нокаут гена uPAR приводит к задержке восстановления периферических нервов у мыши.

Для выяснения роли uPA и uPAR в регенерации периферических нервов мы использовали модель *in vivo* травматического пережатия общего малоберцового нерва (*n. Peroneus communis*). Данный тип травмы соответствует аксонотмезису и характеризуется неполным разрушением аксонов в части, расположенной дистальнее места повреждения и сохранением эпинеурия (внешняя нервная оболочка). При регенерации аксоны постепенно прорастают через место повреждения и ремиелинизируется, что приводит к морфологическому и функциональному восстановлению нерва. Лишь на 7-е сутки с поврежденного нерва может быть зафиксирован первый потенциал действия [125]. Для оценки функционального восстановления нерва после травмы мы измеряли его проводимость: длину латентного периода и амплитуду суммарных

потенциалов действия нерва - СПДН) у контрольных мышей (WT) и нокаутных мышей, у которых отсутствовали uPA (uPA -/-) или uPAR (uPAR -/-).

При оценке СПДН на 7,14 и 21 сутки после повреждения *n. Peroneus communis* наблюдался одинаковый рост амплитуды и укорочение латентного периода у мышей групп WT и uPA-/- (Рис. 11, 12).

На 7 сутки достоверной разницы по амплитуде СПДН между группами не наблюдалось: 0.08 (0.07; 0.09) мВ (n=5) в группе WT по сравнению с 0.078 (0.07;0.096) мВ (n=6) в группе uPA-/- и с 0.09 (0.082; 0.1) мВ (n=8) в группе uPAR-/- (Рис. 11, 12).

При оценке амплитуды СПДН на 14 сутки обнаружено достоверное снижение в показателе в группе uPAR-/- 0.23 (0.2; 0.28) мВ (n=7) по сравнению с мышами из групп WT 0.6 (0.38; 1.3) мВ (n=5) и uPA-/- 0.79 (0.7; 0,86) мВ (n=5) ($p < 0.05$) (Рис. 11, 12).

На 21 сутки амплитуда СПДН была схожей во всех группах: 1.1 (0.75;1.4) мВ (n=5) в группе WT, 1.29 (0.5;1.6) мВ (n=5) в группе uPA-/- и от 1.15 (0,81; 1.37) мВ (n=5) в группе uPAR-/. На более поздних сроках (через 21 сутки после повреждения) большая часть нервных волокон, способных к регенерации, уже проросли от места повреждения к области регистрации вызванных СПДН, в результате чего с течением времени амплитуда СПДН больше не увеличивалась - "выходит на плато", чем и было обусловлено отсутствие разницы между группами.

При изучении латентного периода на 7 сутки наблюдалось его достоверное удлинение у мышей в группе uPAR-/- по сравнению с мышами из групп WT и uPA-/- ($p < 0,05$): 5.8 (3; 8.5) мсек (n=6) в группе uPAR-/- против 2.92 (2,83; 3,74) мсек (n=6) в группе WT и 1,8 (1.58; 2.2) мсек (n=6) в группе uPA-/- (Рис. 11, 12).

На 14 сутки не обнаружено достоверной разницы между группами: 1.44 (1.26;1.6) мсек (n=5) в группе WT по сравнению с 1.62 (1.5;1.8) мсек (n=5) в группе uPA-/- и с 1.3 (1.1; 1.32) мсек (n=7) в группе uPAR-/- .

На 21 сутки также не наблюдалось достоверной разницы по латентному периоду между группами: 0.6 (0.45;0.76) мсек (n=6) в группе WT по сравнению с 0,78 (0,68;0,81) мсек (n=9) в группе uPA-/- и с 0,72 (0,64; 0,79) мсек (n=9) в группе uPAR-/- (Рис. 11, 12).

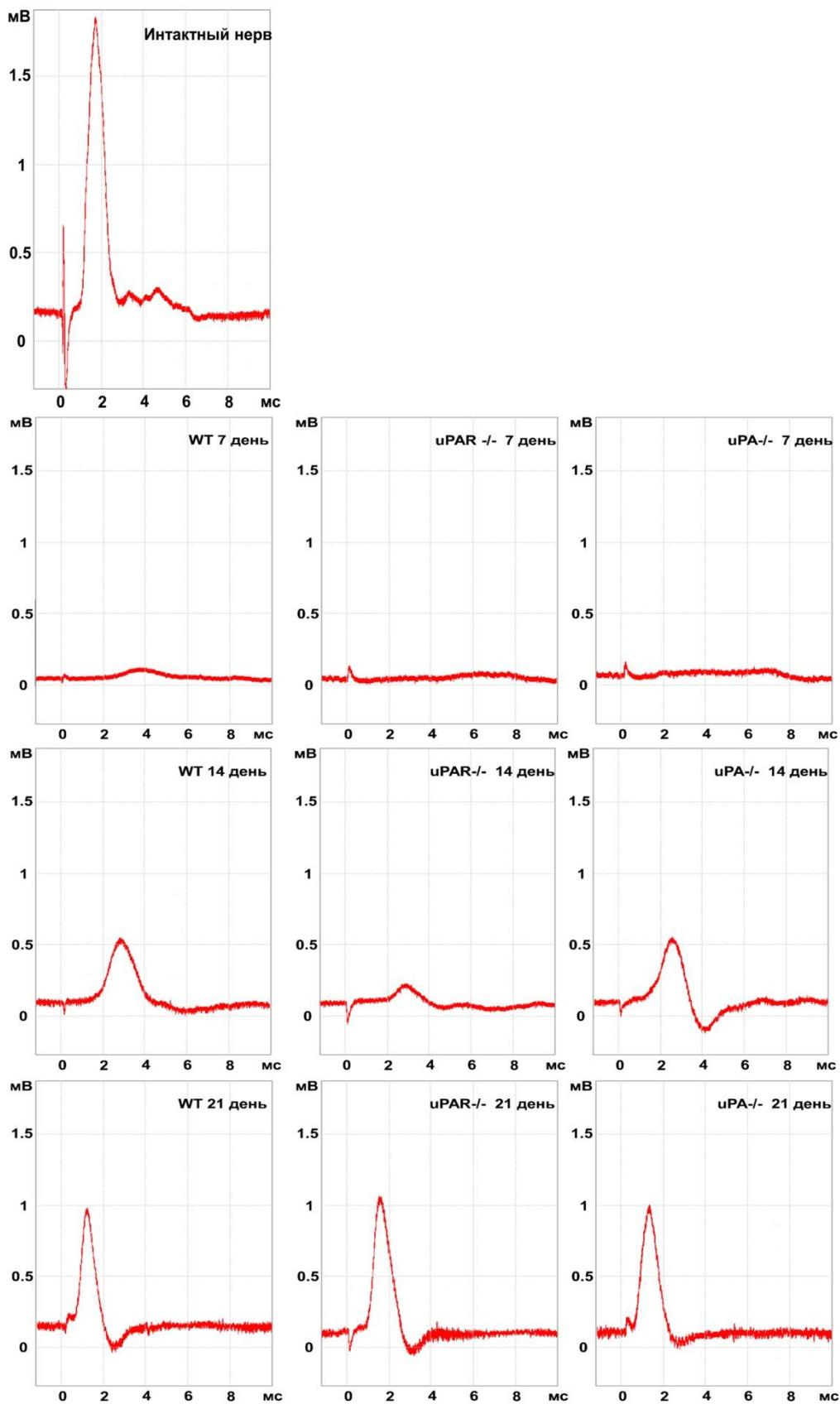


Рис. 11. Изменение профилей СПДН через 7, 14 и 21 дней после травмы нерва у WT, uPAR^{-/-} и uPA^{-/-} мышей.

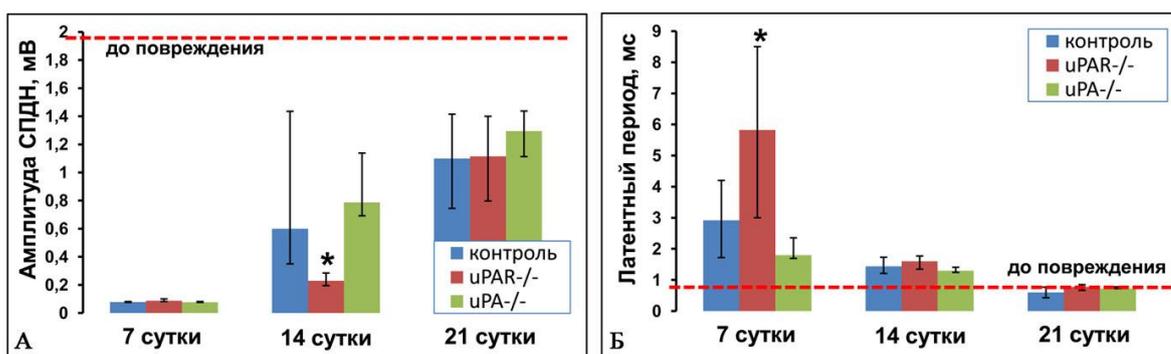


Рис. 12. Оценка проводимости травмированного периферического нерва. А - амплитуда (в мВ); Б - латентный период (в мс). Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. Красной линией отмечены значения параметров для неповрежденного нерва. $n=4-9$, $*p<0,05$, ANOVA on Ranks.

Таким образом, приведенные нами данные свидетельствуют о том, что отсутствие uPAR вызывало задержку в функциональном восстановлении *n. peroneus communis*. Удлинение латентного периода на 7 сутки и уменьшение амплитуды СПДН на 14 сутки после травмы отражает задержку восстановления нерва у uPAR^{-/-} мышей по сравнению с WT и uPA^{-/-} мышами [134]. Из данных литературы известно, что амплитуда СПДН отражает количество функциональных нервных волокон, а латентный период характеризует степень ремиелинизации после повреждения [128]. Поэтому далее мы оценили количество регенерирующих аксонов в малоберцовом нерве через 4, 7, 14, 21 суток после травмы и пролиферацию ШК методом иммунофлуоресцентного окрашивания изолированных нервов WT, uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей.

У мышей, лишенных uPAR, снижается количество регенерирующих аксонов в нерве.

Обнаружив разницу в функциональном восстановлении *n. Peroneus communis* после травмы у uPAR^{-/-} мышей по сравнению с uPA^{-/-} и WT мышами, мы использовали морфологический анализ, применяя

иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных срезов интактных (неповрежденных) и травмированных нервов на 4, 7, 14, 21 сутки после повреждения антителами к NF200 [135]. Поперечные криосрезы травмированных нервов были получены на расстоянии 2 мм дистальнее места повреждения.

При подсчете количества NF200-положительных аксонов в интактных *n. Peroneus communis* различий между мышами WT ($685 \pm 15,2$), uPA -/- ($665 \pm 10,3$) и uPAR -/- мышами ($660 \pm 15,1$) ($p > 0,05$) не наблюдалось. Пережатие нерва вызывало существенную деградацию аксонов у всех групп мышей: на 4 день после травмы количество аксонов снижалось в 6-8 раз.

Обнаружено, что после травмы на всех сроках эксперимента количество аксонов у WT и у uPA-/- мышей было одинаковым, в то время как у uPAR-/- мышей данный показатель был снижен (Рис. 13, 14). Мы обнаружили 4-кратное уменьшение количества NF200-положительных аксонов в нерве uPAR-/- мышей ($17,7 \pm 12$) по сравнению с WT ($69,3 \pm 3,78$) ($p < 0,05$, $n = 3$) и uPA -/- мышами ($73 \pm 5,3$) ($p < 0,05$) на 4-й день после травмы. Через 7 дней после травмы число NF200-положительных аксонов в группе uPAR -/- ($132 \pm 40,1$) было в 2 раза меньше, чем у WT ($338,3 \pm 53,5$) ($p < 0,002$) и uPA -/- ($305 \pm 8,9$) ($p < 0,05$). Статистически значимое различие между количеством аксонов у uPAR -/- мышей ($306,6 \pm 20,5$), WT ($507 \pm 8,1$) ($p < 0,05$), и uPA -/- мышами ($510 \pm 19,6$) ($p < 0,05$) сохранялось до 14 дней после травмы (Рис. 13, 14). На 21 наблюдалась тенденция к снижению количества аксонов у uPAR -/- ($496 \pm 26,3$) мышей по сравнению с WT ($589 \pm 36,2$) и uPA -/- ($538 \pm 45,6$) ($p = 0,057$), хотя достоверной разницы уже не обнаруживалось ссылка на тезисы. Таким образом, полученные результаты показывают, что нокаут uPAR приводит к снижению количества регенерирующих аксонов после травмы *n. Peroneus communis*, что проявляется как функционально, так и морфологически. Следует отметить,

что нокаут uPA не приводил к задержке в регенерации аксонов *n. Peroneus communis*.

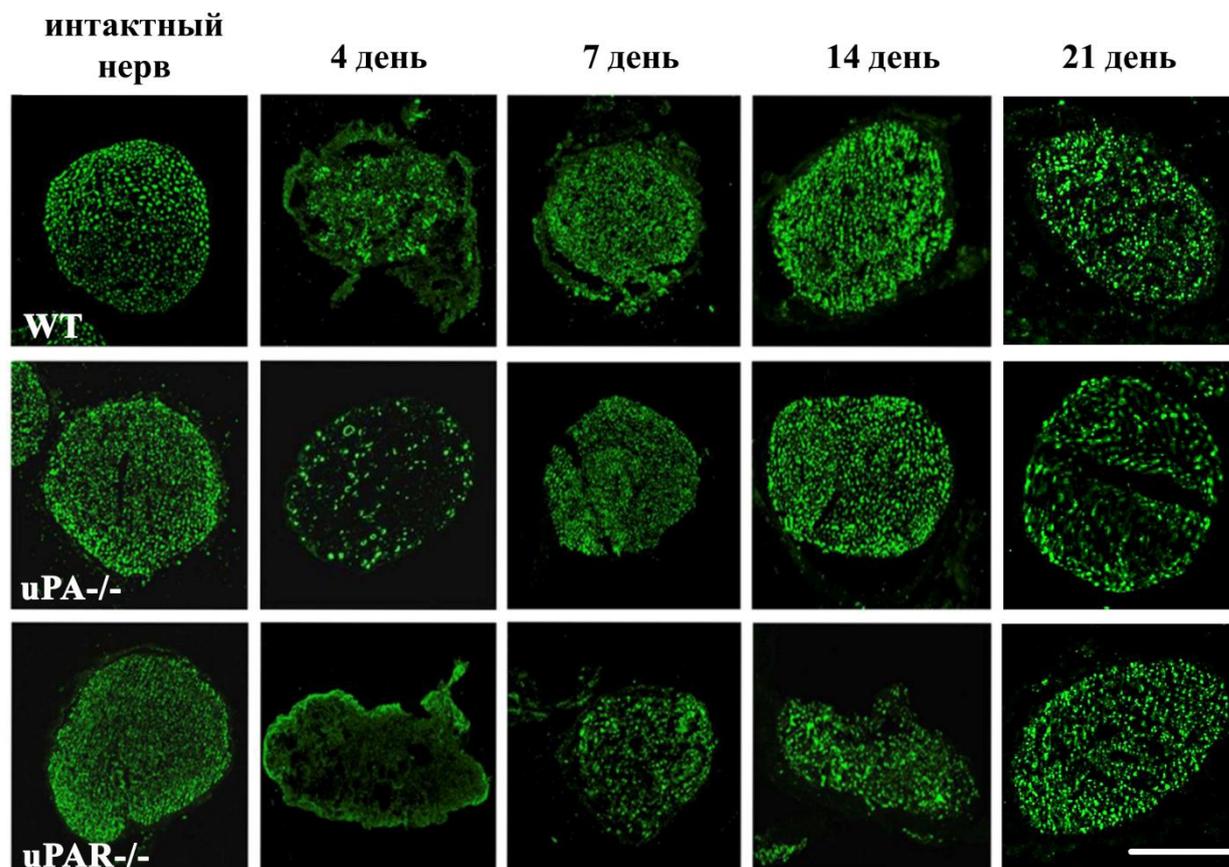


Рис. 13. Восстановление структуры периферического нерва после травмы. Иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных криосрезов нервов WT, uPA-/- и uPAR-/- мышей антителами к NF200. Представлены интактные нервы и на 4,7,14 и 21 сутки после травмы. Масштабный отрезок = 250 мкм.

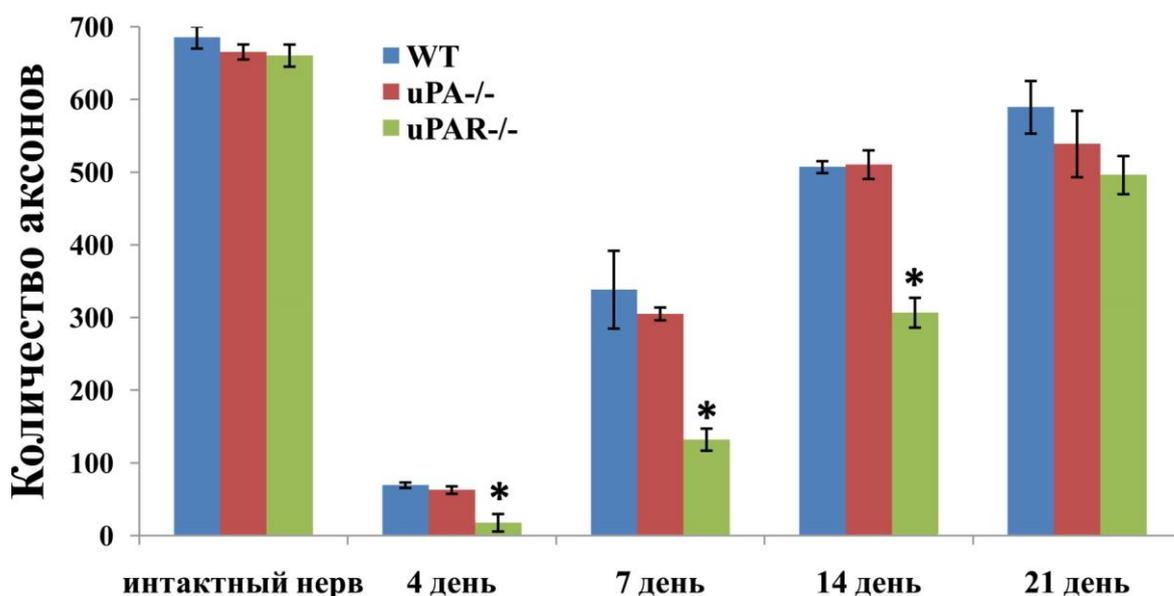


Рис. 14. Анализ количества NF-200 положительных аксонов. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 4$, $*p < 0.05$, ANOVA).

Нокаут гена uPAR приводит к снижению пролиферации Швановских клеток в регенерирующем нерве.

Удлинение латентного периода у uPAR -/- мышей по сравнению с мышами WT и uPA -/- может свидетельствовать о нарушении ремиелинизации нерва после травмы [136, 137]. Повреждение нерва вызывает активацию процессов регенерации, важную роль в которых играют ШК. Установлено, что после травмы нерва ШК дедифференцируются и начинают экспрессировать GFAP - маркер незрелых ШК [3, 138]. Дедифференцированные ШК пролиферируют и мигрируют, обеспечивая путь для роста и регенерации аксонов [3]. Чтобы оценить влияние uPAR на пролиферацию ШК мы провели двойное иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антител против GFAP и Ki67 - классического маркера клеток, находящихся в цикле пролиферации [139]. Окрашивание проводили с использованием продольных срезов дистальной культивированной нервов, выделенных из WT, uPA-/- и uPAR-/- мышей на 7 сутки после травмы. Анализ с использованием конфокальной микроскопии с

последующей количественной обработке изображений в программе ImageJ показал одинаковое количество клеток, экспрессирующих оба маркера, GFAP и Ki67, у WT и uPA^{-/-} мышей, однако количество двойных GFAP и Ki67-позитивных клеток у uPAR^{-/-} мышей было достоверно меньше по сравнению с другими группами, что свидетельствует о снижении пролиферации ШК у мышей данной группы (Рис. 15, 16).

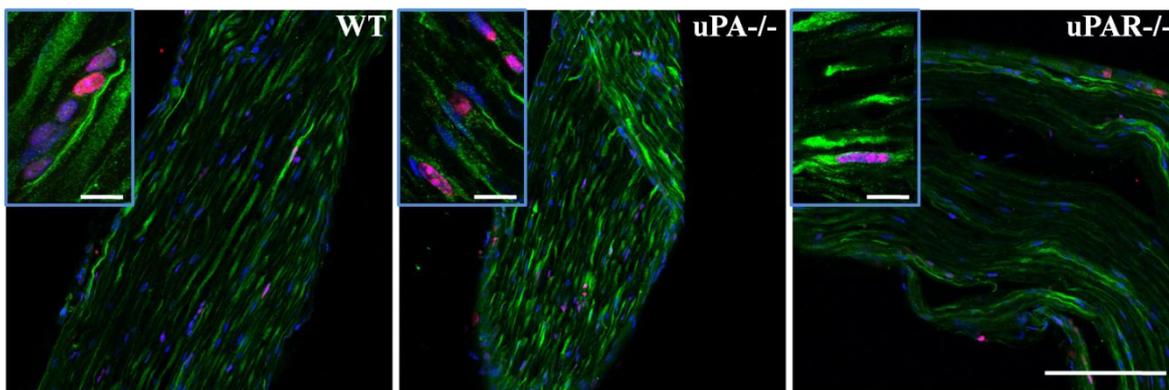


Рис. 15. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание продольных криосрезов нервов WT, uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей антителами к GFAP (зеленая флуоресценция) и Ki67 (красная флуоресценция) на 7 день после травмы. Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок = 150 мкм. На вставках представлены клетки, снятые на 63-кратном увеличении. Масштабный отрезок = 5 мкм.

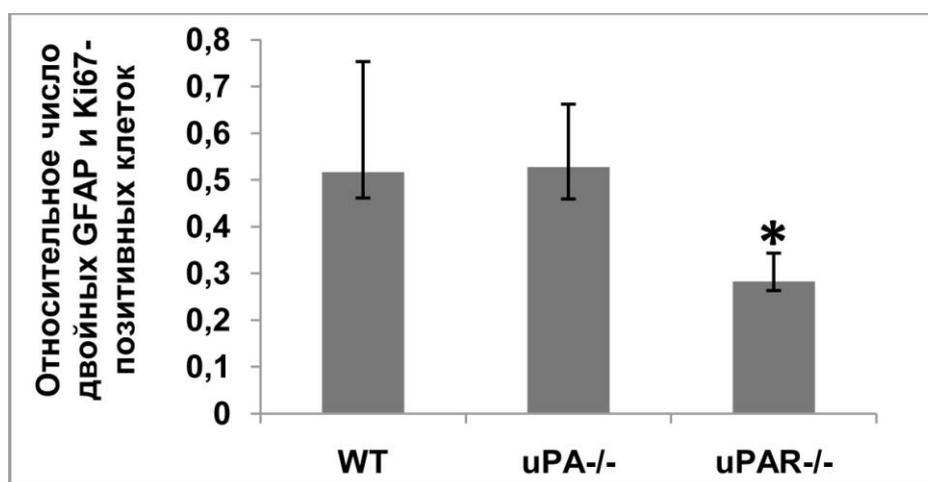


Рис. 16. Анализ пролиферативной активности ШК. Представлено отношение количества двойных GFAP и Ki67-позитивных клеток к общему числу клеток

на 7 день после травмы. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. $n=6$, $*p<0.05$, ANOVA on Ranks.

Уровень экспрессия $\alpha 5\beta 1$ -интегринов коррелирует с экспрессией uPAR в интактных нервах.

В экспериментах, описанных выше, мы наблюдали эффекты uPAR, проявляемые в отсутствие uPA, что может свидетельствовать о наличии других белков-партнеров uPAR, взаимодействие с которыми стимулирует регенерацию. Известно, что uPAR может взаимодействовать с FPRL, EGFR, LRP-1, интегринами, Endo180 и т.д. [77]. Важную роль в регенерации нервов играет внеклеточный матрикс и его взаимодействие с молекулами клеточной адгезии, более того, известно, что uPAR способен латерально взаимодействовать с интегринами. Чтобы выявить возможные механизмы влияния uPAR в отсутствие uPA на восстановление нервов, во-первых, мы оценили характер и уровень экспрессии uPAR, $\beta 3$ -тубулина и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в интактных и регенерирующих нервах uPA-/-, uPAR-/- и WT мышей.

Мы провели двойное иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против $\beta 3$ -тубулина, uPAR, $\alpha 5$ и $\beta 1$ -интегринов с использованием продольных срезов изолированных интактных *n. Peroneus communis* трех типов мышей. У uPA-/- мышей наблюдалась повышенная экспрессия uPAR по сравнению с мышами WT (Рис.17), в то время как различий в экспрессии $\alpha 5$ и $\beta 1$ -интегринов обнаружено не было (Рис. 18, 19).

При окрашивании нервов, полученных от uPAR-/- мышей, было обнаружено, что экспрессия $\beta 1$ интегрин была снижена в 1,57 раз, а экспрессия $\alpha 5$ интегрин - в 3,5 раза (Рис. 20) по сравнению с мышами дикого типа (WT). Мы не наблюдали со-локализации uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринными в интактных нервах. Уровень экспрессии $\beta 3$ -тубулина оставался на одном уровне у всех типов мышей.

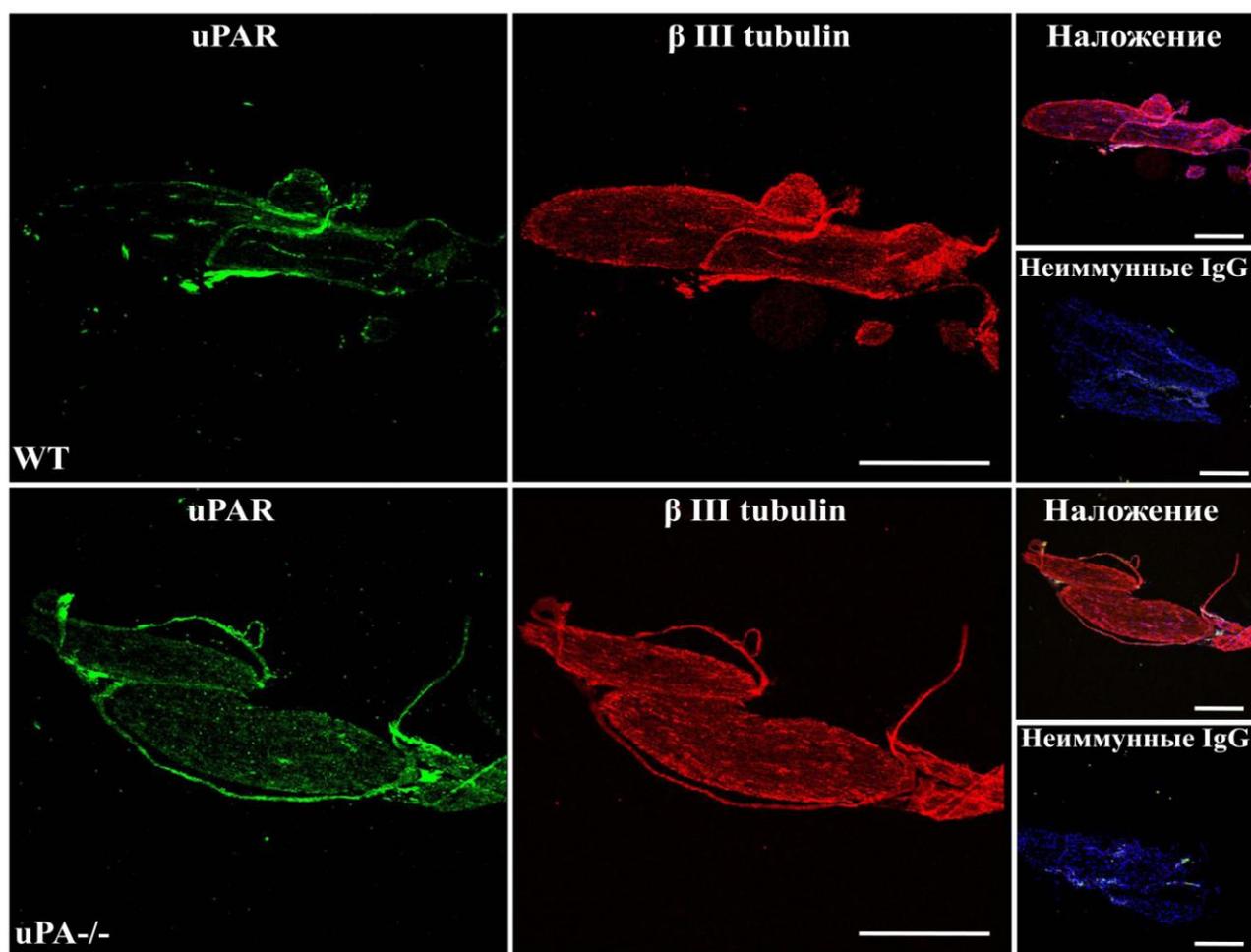


Рис. 17. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание продольных криосрезов intactных нервов WT и uPA^{-/-} мышей с использованием антител к uPAR (зеленая флуоресценция), βIII-тубулину (красная флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок 250 мкм.

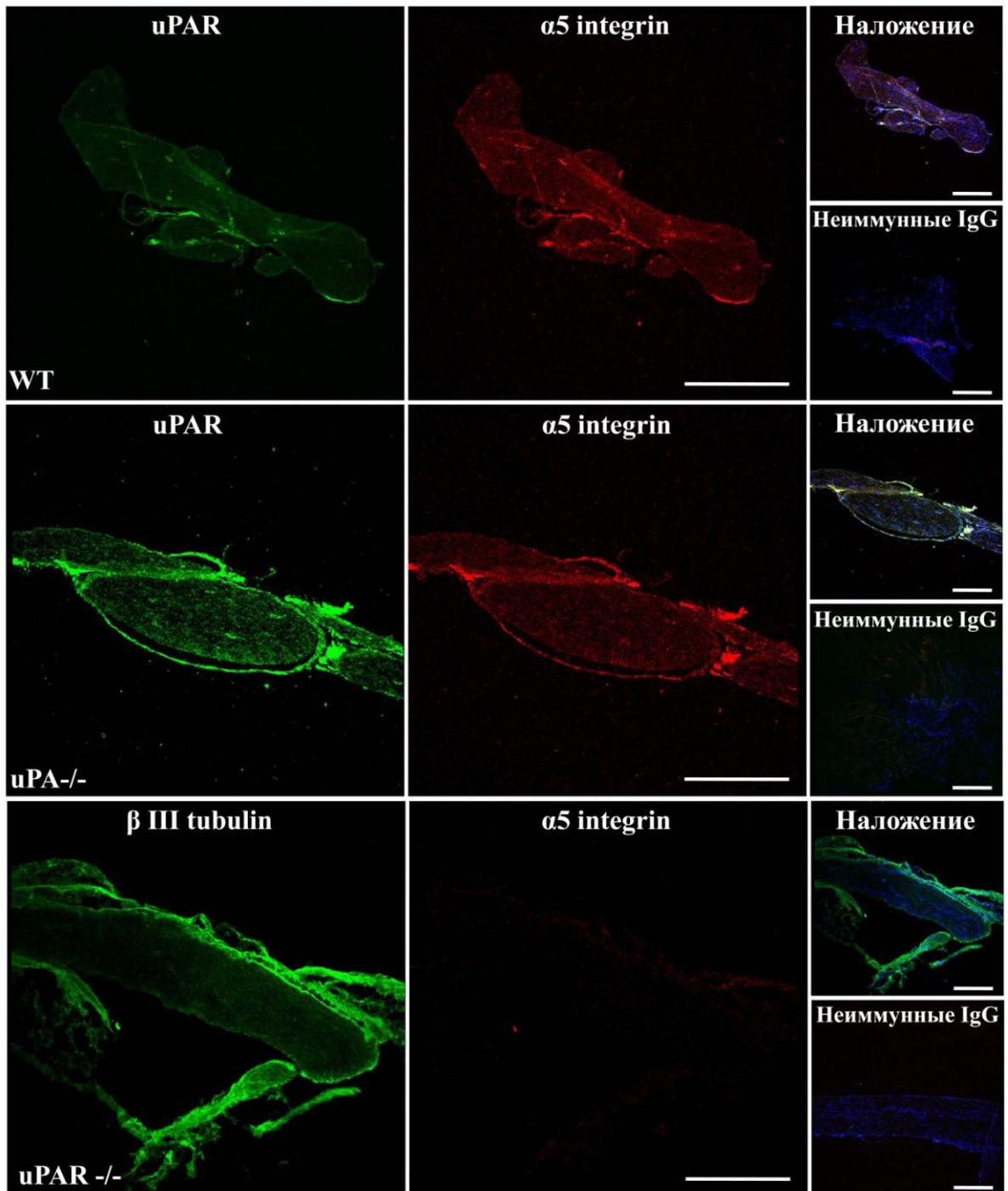


Рис. 18. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание продольных криосрезов интактных нервов WT, $uPA^{-/-}$ и $uPAR^{-/-}$ мышей с использованием антител к uPAR (зеленая флуоресценция), β III-тубулину (зеленая флуоресценция) и $\alpha 5$ -интегрину (красная флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок 250 мкм.

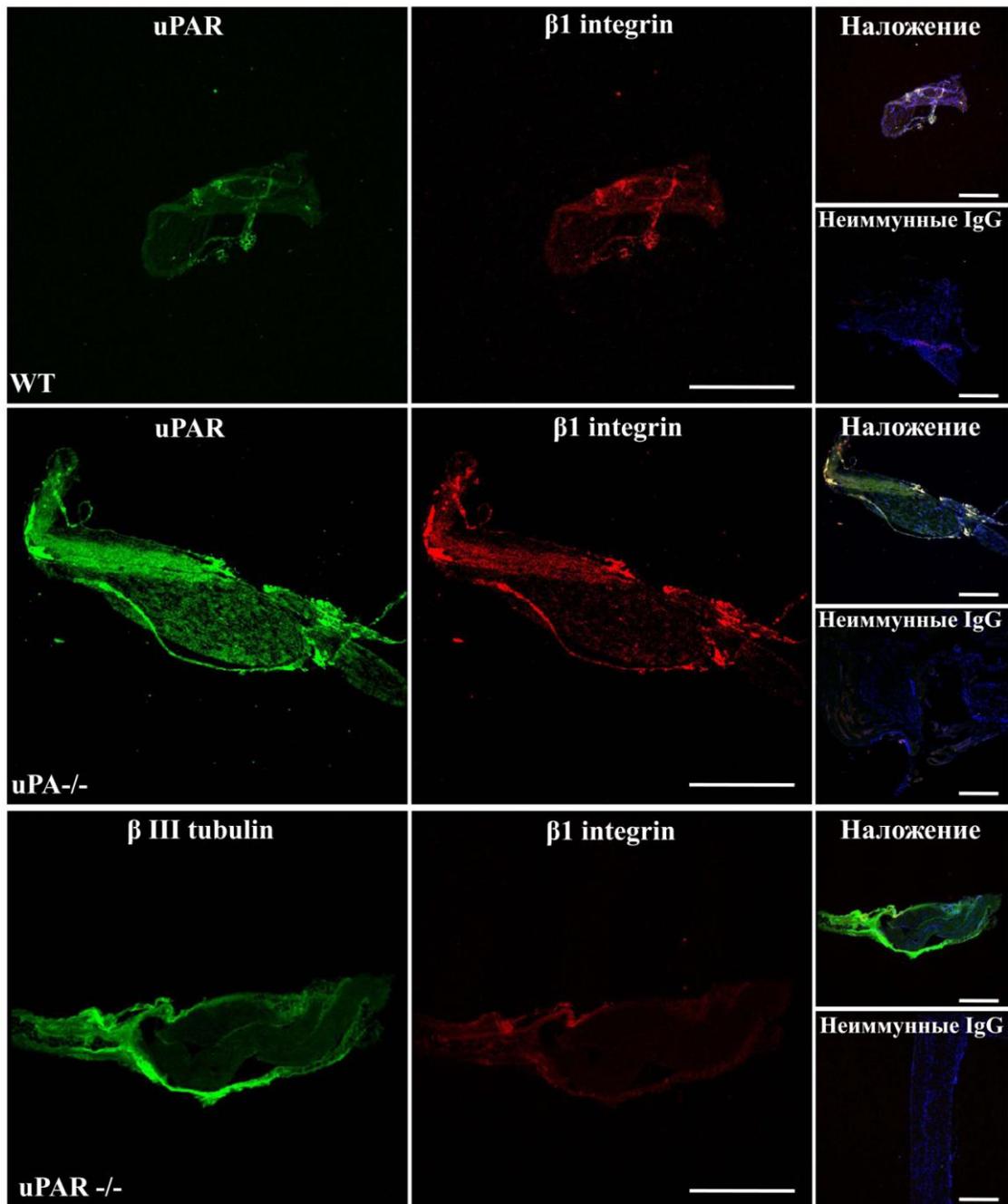


Рис. 19. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание продольных криосрезов интактных нервов WT, uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей с использованием антител к uPAR (зеленая флуоресценция), β III-тубулину (зеленая флуоресценция) и $\beta 1$ -интегрину (красная флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок 250 мкм.

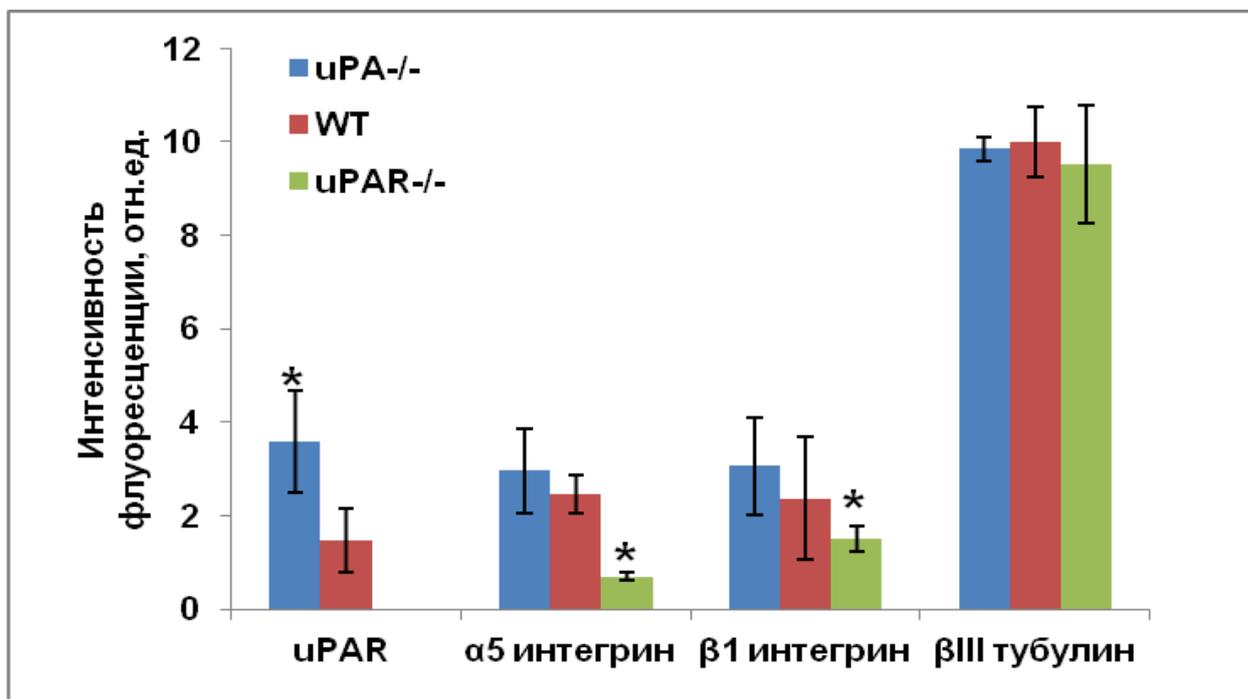


Рис. 20. Анализ интенсивности флуоресценции uPAR, α5- и β1-интегринов и βIII-тубулина в интактных нервах WT, uPA-/- и uPAR-/- мышей. Результаты нормировали на площадь среза нерва. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. n = 6, *p<0.05.

При регенерации нерва увеличивается экспрессия и солокализация uPAR и α5β1-интегринов.

На следующем этапе мы провели двойное иммунофлуоресцентное окрашивание участков *n. Peroneus communis*, расположенных проксимальнее и дистальнее места повреждения, антителами против uPAR, α5- (Рис. 21) и β1- интегринов (Рис. 22) на 4 сутки после травмы у uPA -/- и WT мышей. Мышей uPAR-/- в эксперимент не брали, так как предполагалось оценивать взаимодействие uPAR с интегринными. Мы обнаружили, что у uPA-/- мышей интенсивность флуоресценции uPAR повышалась в 2,4 раза, α5-интегрин - в 2,7 раз и β1-интегрин в 2 раза (p<0.05) по сравнению с WT мышами как в проксимальной, так и в дистальной частях нерва. Далее мы количественно оценили солокализацию uPAR с α5- и β1-интегринными, используя коэффициенты солокализации Мандерса M1 (доля uPAR в интегрине) и M2

(доля интегрин в uPAR) [140]. Значения коэффициентов M1 и M2 варьируются от 0 до 1. Идеальная (или полная) солокализация соответствует значению коэффициента 1 (M=1). Мы обнаружили, что у WT мышей 55% uPAR солокализовалось с $\alpha 5$ -интегрином (Таблица 1) и 56% с $\beta 1$ -интегрином (Таблица 2). У uPA-/- мышей солокализация uPAR с интегринами повышалась: 90% uPAR солокализовалось с $\alpha 5$ -интегрином ($p = 0,01$) и 80% - с $\beta 1$ -интегрином ($p = 0,031$). Значения коэффициентов M2 указывали на почти полную солокализацию $\alpha 5$ и $\beta 1$ интегринов с uPAR у WT и uPA-/- мышей (Таблица 1, 2, Рис. 21, 22). Повышенная экспрессия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегрин и их солокализация временно и пространственно совпадают с активной фазой регенерации нервов [6-8, 141, 142]. Эти данные свидетельствуют о физиологической значимости наблюдаемой солокализации и о возможной сборке функционального комплекса uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрин и его потенциальном участии в восстановлении нерва.

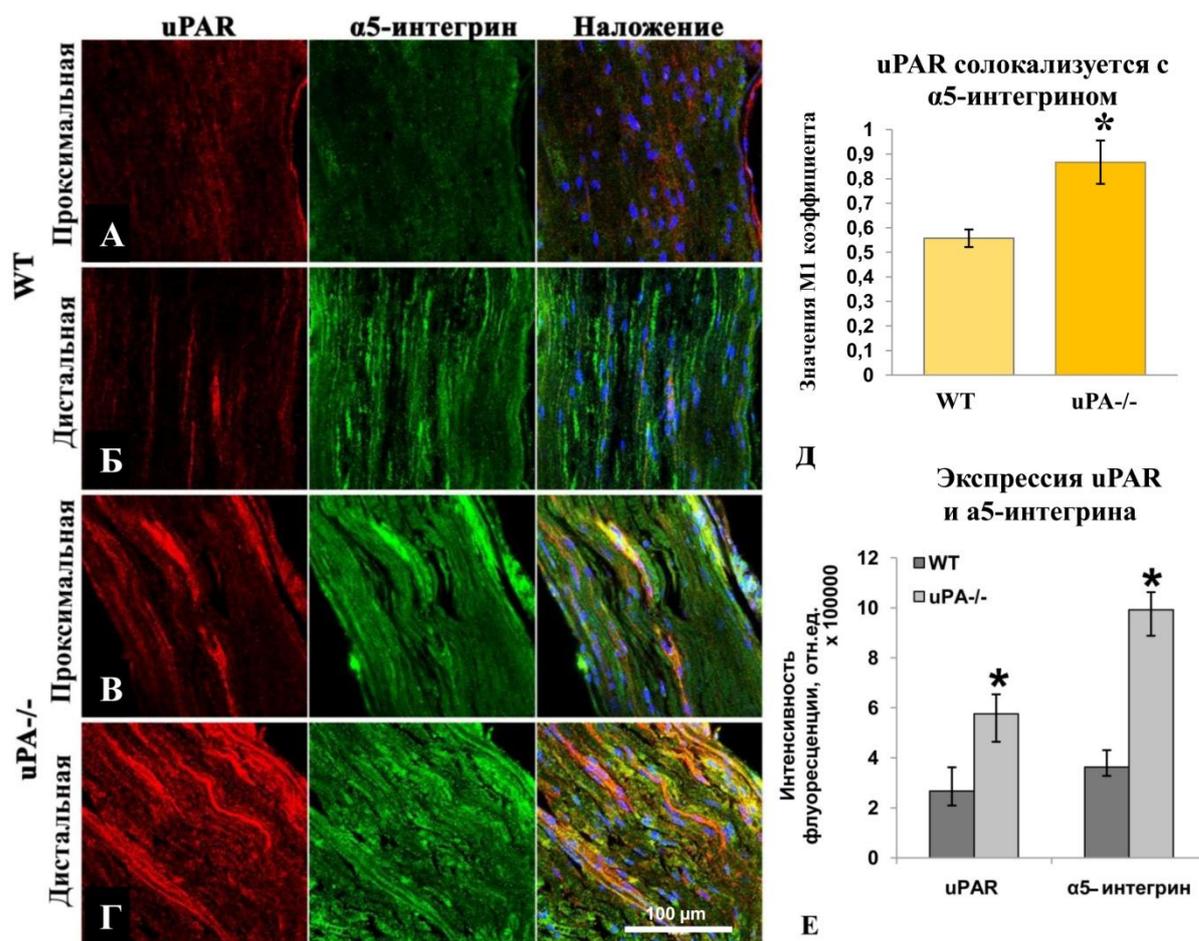


Рис. 21. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание проксимальной и дистальной частей нервов после повреждения WT мышей (А, Б) и uPA-/- мышей (В, Г) с использованием антител к uPAR (красная флуоресценция) и $\alpha 5$ -интегрину (зеленая флуоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. Д – Анализ сококализации uPAR с $\alpha 5$ -интегрином. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. n=6, *p<0.05, Т-тест. Е – Анализ интенсивности флуоресценции uPAR и $\alpha 5$ -интегрина в нервах от WT, uPA-/- и uPAR-/- мышей. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. n=6, *p<0.05, ANOVA.

Коэффициент	WT мыши	uPA-/- мыши	P-значение
M1	0.56 \pm 0.04	0.9 \pm 0.09	p = 0.01
M2	0.98 \pm 0.01	0.97 \pm 0.02	p > 0.05

Таблица 1. Анализ солокализации сигналов флуоресценции uPAR и $\alpha 5$ -интегрина. M1 (доля сигнала uPAR, перекрывающего сигнал $\alpha 5$ -интегрина), M2 (доля сигнала $\alpha 5$ -интегрина, перекрывающего сигнал uPAR). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, n = 6, T-тест.

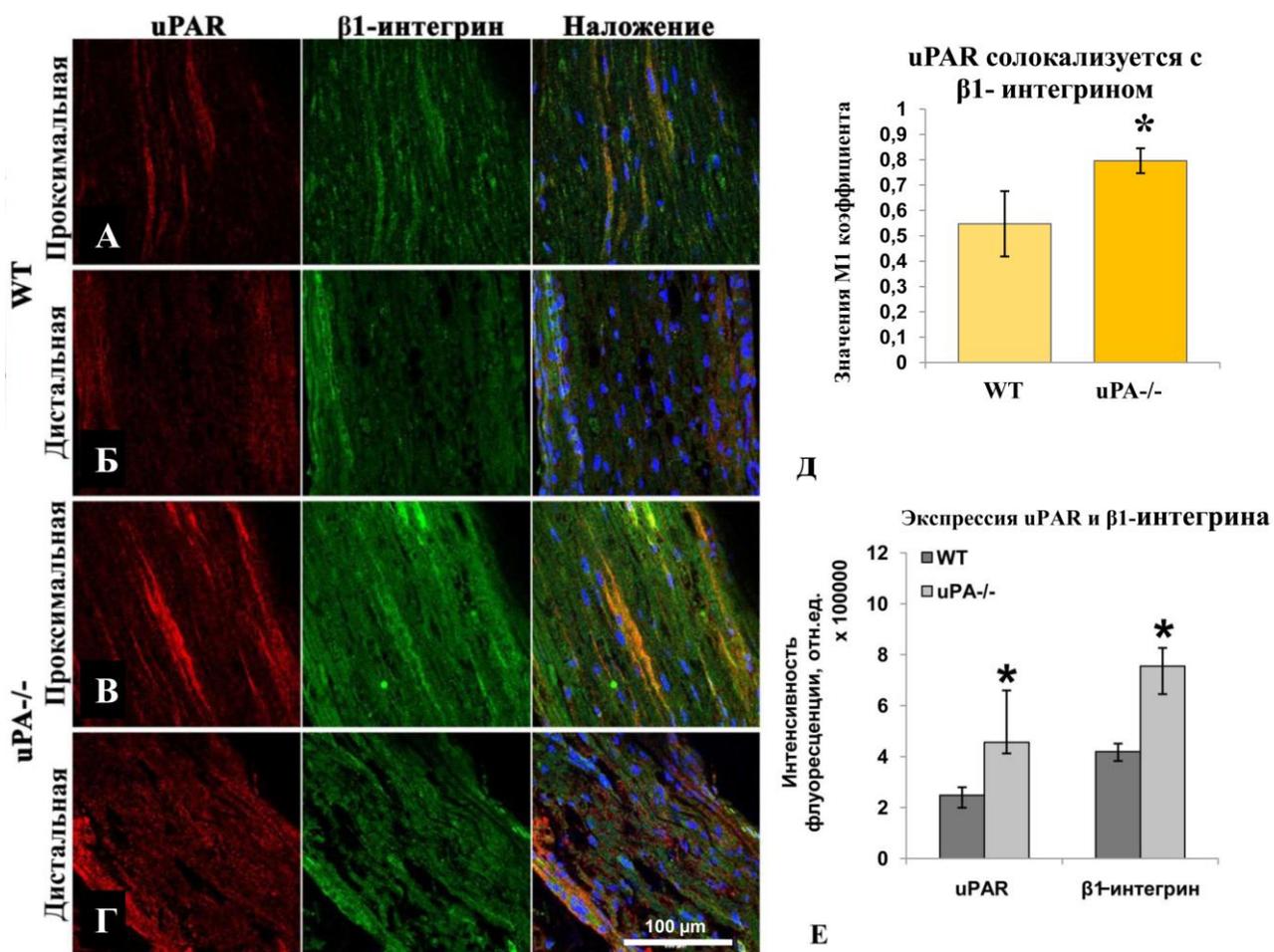


Рис. 22. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание проксимальной и дистальной частей поврежденных нервов WT (А, Б) и uPA^{-/-} мышей (В, Г) с использованием антител к uPAR (красная флуоресценция) и $\beta 1$ -интегрину (зеленая флуоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. Д – Анализ солокализации uPAR с $\beta 1$ -интегрином. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. n=6, *p<0.05, T- тест. Е – Анализ интенсивности флуоресценции uPAR и $\beta 1$ -интегрина в поврежденных нервах WT, uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. n=6, *p<0.05, ANOVA.

Коэффициент	WT мыши	uPA ^{-/-} мыши	P-значение
M1	0.55 ± 0.12	0.8 ± 0.03	p = 0.031
M2	0.95 ± 0.05	0.98 ± 0.02	p > 0.05

Таблица 2. Анализ солокализации сигналов флуоресценции uPAR и β 1-интегрина. M1 (доля сигнала uPAR, перекрывающего β 1-интегрин), M2 (доля сигнала β 1 интегрин перекрывающего uPAR). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, n = 6, T-тест.

Получение клеточной линии N2A с гиперэкспрессией и с подавленной экспрессией гена uPAR.

В экспериментах *in vivo* мы обнаружили, что отсутствие uPAR приводит к задержке в регенерации периферического нерва. Регенерация нервов зависит, в том числе, и от способности поврежденных аксонов к элонгации. Чтобы оценить участие uPAR в формировании нейритов, были созданы клетки N2A с разным уровнем экспрессии uPAR. Для этого использовали плазмидные вектора для гиперэкспрессии uPAR (N2A-uPAR \uparrow) и shRNA для подавления экспрессии uPAR (N2A-uPAR \downarrow). Экспрессию uPAR оценивали с использованием RT-PCR (Рис. 23А) и методом Вестерн-блоттинга (Рис. 23В). Плазмидный вектор, кодирующий shRNA, снижал уровень экспрессии мРНК uPAR по меньшей мере в 1,32 раза, тогда как использование pN1-uPAR увеличивало уровень мРНК uPAR в 181 раз.

Изменение экспрессии uPAR и его экспонирования на мембране также подтвердили методом Вестерн-блоттинга после фракционирования клеточных лизатов. При анализе содержания uPAR в субклеточных фракциях (ядерной, мембранной и цитоплазматической) и в общем лизате, оказалось, что по сравнению с контрольными клетками экспрессия uPAR в N2A-uPAR \uparrow клетках повышалась как в общем лизате (в 1,6 раза), так и в мембранной

фракции (в 3,7 раза), тогда как в N2A-uPAR↓ клетках экспрессия uPAR снижалась в общем лизате (в 2,8 раз), а в мембранной фракции (в 6 раз).

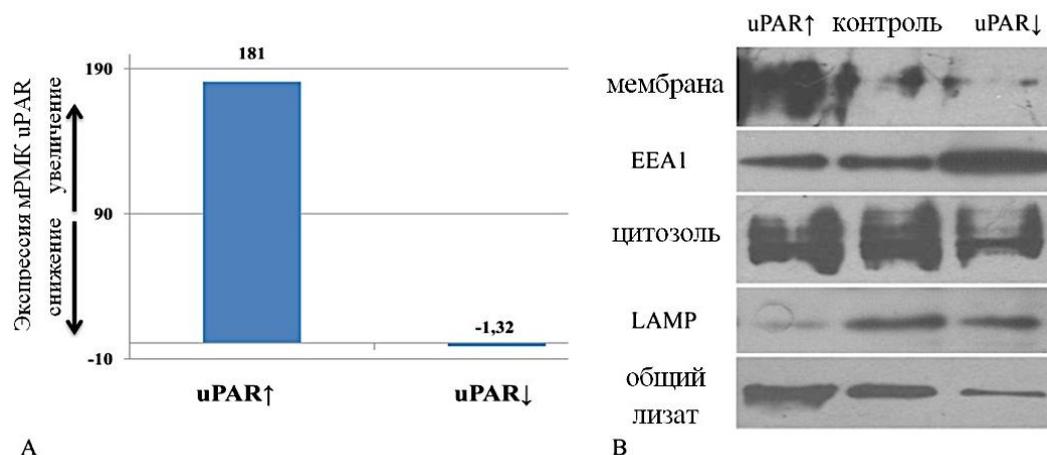


Рис. 23. **А** - анализ содержания мРНК uPAR в клетках с гиперэкспрессией uPAR и после подавления экспрессии uPAR по сравнению с контрольными клетками. Уровень экспрессии в контрольных клетках был условно принят равным 0. **В** – анализ содержания uPAR в различных клеточных фракциях тех же клеток методом Вестерн-блоттинга. EEA1 – маркер мембранных и ранних эндосомальных белков, LAMP - маркер лизосом, используемый для выявления цитозольных белков.

uPAR индуцирует сборку комплекса $\alpha 5\beta 1$ -интегринов на плазматической мембране клеток N2A.

Таким образом, используя модель травматического пережатия нерва, мы обнаружили, что при травме увеличивается экспрессия uPAR и его солокализация с интегринными. Для подтверждения релевантности полученных результатов далее мы использовали модель нейритогенеза *in vitro* на клетках N2A и оценивали взаимодействие между uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринными на мембране клеток.

Три типа клеток N2A (контрольные, N2A-uPAR↓, N2A-uPAR↑) культивировали в среде DMEM, содержащей 1% фетальной бычьей сыворотки, для стимуляции формирования нейритов [129] и анализировали

экспрессию/солокализацию uPAR с $\alpha 5$ - и $\beta 1$ - интегринами на плазматической мембране методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания в непроницаемых условиях (Рис. 24). Было обнаружено, что гиперэкспрессия uPAR приводила к увеличению интенсивности флуоресценции $\beta 1$ -интегрин в 1,54 раз, а $\alpha 5$ -интегрин - в 1.8 раз ($p < 0.05$). При гиперэкспрессии uPAR достоверно возрастала солокализация как uPAR с $\alpha 5$ - и $\beta 1$ - интегринами, так и интегринов с uPAR по сравнению с контрольными клетками ($p < 0.05$) (Таблицы 3, 4). При подавлении экспрессии uPAR мы наблюдали противоположный эффект: снижение интенсивности флуоресценции $\beta 1$ -интегрин в 1.9 раз и $\alpha 5$ -интегрин - в 4,7 раза ($p < 0.05$), а также отсутствие солокализации как uPAR с интегринами, так и интегринов с uPAR.

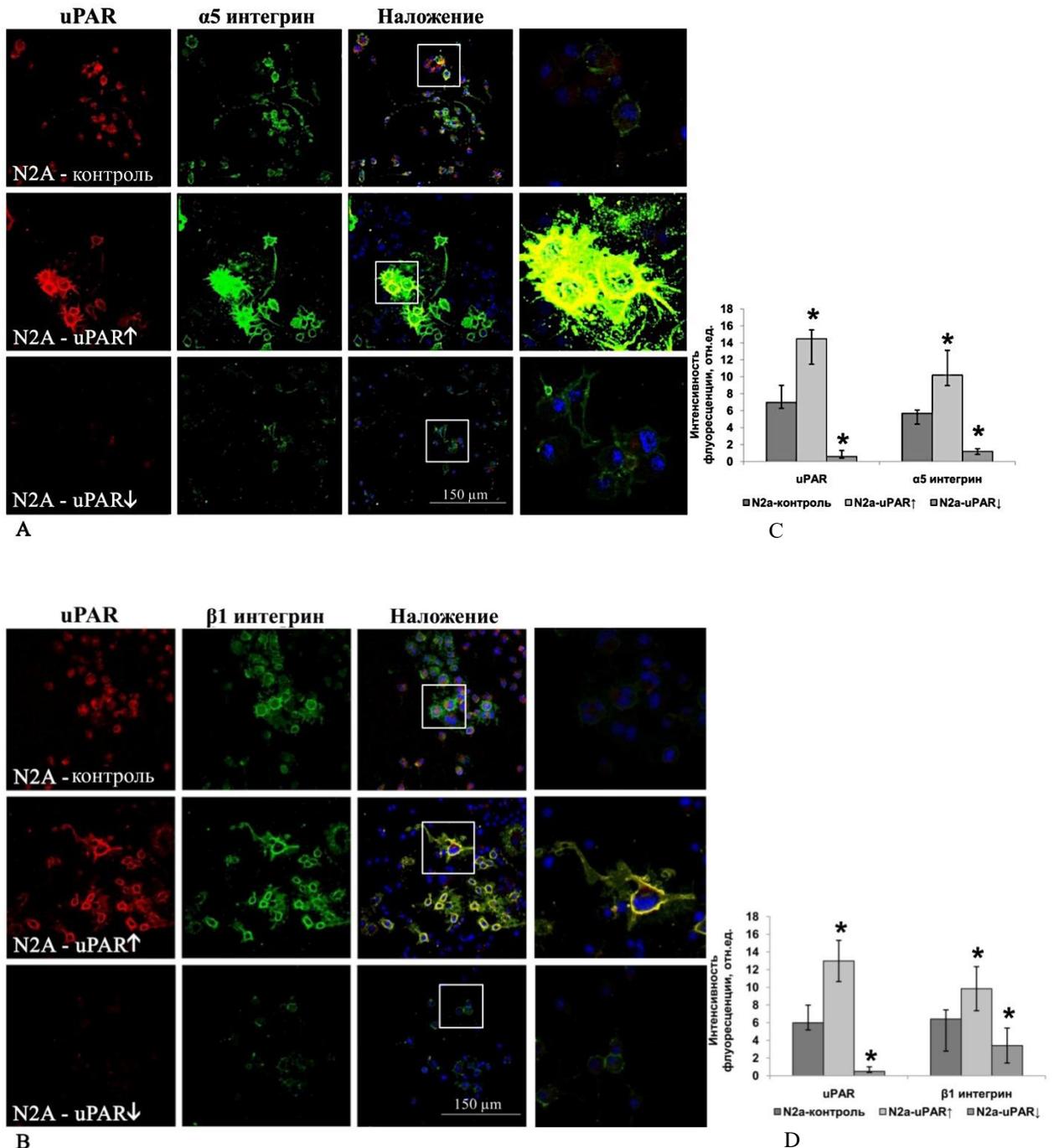


Рис. 24. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток N2A антителами к uPAR (красная флуоресценция), $\alpha 5$ - (A) и $\beta 1$ - (B) интегринам (зеленая флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. C, D – анализ интенсивности флуоресценции uPAR, $\alpha 5$ - (C) и $\beta 1$ - (D) интегринов в трех типах клеток. Результаты нормировали на размер клеток. Данные представлены как медианы \pm 25% и 75% процентиля. $n=6$, $p < 0,05$, ANOVA on Ranks. Масштабный отрезок 150 мкм

Коэффициент	N2A-контроль	N2A - uPAR↑	P значение
M1	0.554 ± 0.07	0.753 ± 0.058	p = 0.036
M2	0.645 ± 0.183	0.83 ± 0.059	p = 0.013

Таблица 3. Анализ солокализации сигналов uPAR и $\alpha 5$ -интегрина. M1 (доля сигнала uPAR, перекрывающего $\alpha 5$ -интегрин), M2 (доля сигнала $\alpha 5$ -интегрина, перекрывающего uPAR). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, n = 6, T-тест.

Коэффициент	N2A-контроль	N2A - uPAR↑	P значение
M1	0.534 ± 0.125	0.762 ± 0.138	p = 0.048
M2	0.594 ± 0.173	0.84 ± 0.133	p = 0.049

Таблица 4. Анализ солокализации сигналов uPAR и $\beta 1$ -интегрина. M1 (доля сигнала uPAR перекрывающего $\beta 1$ -интегрин), M2 (доля сигнала $\beta 1$ -интегрина, перекрывающего uPAR). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, n = 6, T-тест.

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

Поскольку мы показали, что uPAR солокализуется с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами при регенерации *n. Peroneus communis* у uPA -/- и WT мышей, а также в клетках N2A, экспрессирующих uPAR, мы предположили, что сборка комплекса и взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами на поверхности клетки имеет важное значение для формирования нейритов. Из литературы известно, что uPAR латерально взаимодействует с α -субъединицей интегринов в области D2-домена [104]. Разными авторами были разработаны пептиды, содержащие последовательности α -субъединиц интегринов, способные ковалентно связываться с uPAR, разобщая при этом его взаимодействие с интегринами, но не нарушая функционирование последних

[105, 116, 131]. Чтобы доказать, что наблюдаемая солокализация uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов имеет физиологическую значимость, мы синтезировали пептид $\alpha 325$ специфически разобщающий взаимодействие uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов. В эксперименте использовали клетки N2A с разным уровнем экспрессии uPAR (uPAR \uparrow , Δ uPAR и контрольные) и оценивали способность клеток формировать нейриты в присутствии блокирующего пептида в среде культивирования. В данных экспериментах для подавления экспрессии uPAR использовали систему CRISPR/Cas9, что позволило получить клетки с полным нокаутом uPAR [130].

Клетки N2A культивировали на фибронектине или на непокрытом пластике в среде DMEM, содержащей 1% ФБС, для стимуляции нейритогенеза. В среду для культивирования вносили uPA (10нМ) или блокирующий пептид $\alpha 325$ (100 нМ), или контрольный пептид s325 (100 нМ). Через 72 часа подсчитывали количество клеток, сформировавших нейриты (нейритсодержащие клетки). Нейритами считали отростки клеток, превышающие размер тела нейрона в два раза и более.

Было обнаружено, что добавление разобщающего $\alpha 325$ пептида к WT клеткам резко снижает количество клеток с нейритами при культивировании как на фибронектине (в 3,6 раз, $p=0,037$), так и на непокрытом пластике (в 2 раза, $p=0.049$) по сравнению с контрольным s325 пептидом (Рис. 25, 26).

При добавлении uPA к WT клеткам при культивировании на пластике имелась тенденция к увеличению количества клеток с нейритами по сравнению с контрольной средой ($p=0.08$) (Рис. 25, 26), однако при культивировании на фибронектине достоверной разницы в количестве нейритсодержащих клеток нет.

Клетки с нокаутом uPAR при культивировании как на фибронектине, так и на непокрытом пластике не отвечали на введение добавок: добавление uPA

не увеличивало формирование нейритов, а разобщающий пептид не приводил к снижению нейритогенеза.

Мы обнаружили, что при инкубации в присутствии разобщающего $\alpha 325$ пептида, культура uPAR \uparrow клеток содержала достоверно меньше нейритсодержащих клеток по сравнению с контрольным s325 пептидом при культивировании как на фибронектине (в 2 раза, $p=0.02$), так и на пластике (в 2,3 раза, $p=0,017$). Добавление uPA к uPAR \uparrow клеткам увеличивает количество клеток с нейритами по сравнению с контрольной средой при культивировании как на пластике ($p=0,036$), так и на фибронектине ($p = 0,009$).

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 ($p<0,01$) при культивировании как на фибронектине, так и на пластике. В тех же условиях разницы в нейритсодержащих клетках между группами WT и uPAR \uparrow не наблюдалось.

Таким образом, при культивировании клеток на фибронектине или на непокрытом пластике введение контрольного s325 пептида не оказывало негативного влияния на клетки и нейритогенез, тогда как введение разобщающего $\alpha 325$ пептида значительно снижало данный показатель в культурах клеток, где присутствовал uPAR (WT и uPAR \uparrow), что говорит о специфичности действия пептидов. Эти данные свидетельствуют о том, что взаимодействие uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов имеет важное физиологическое значение для нейритогенеза, поскольку блокирование этого взаимодействия при помощи разобщающего пептида снижает нейритогенез.

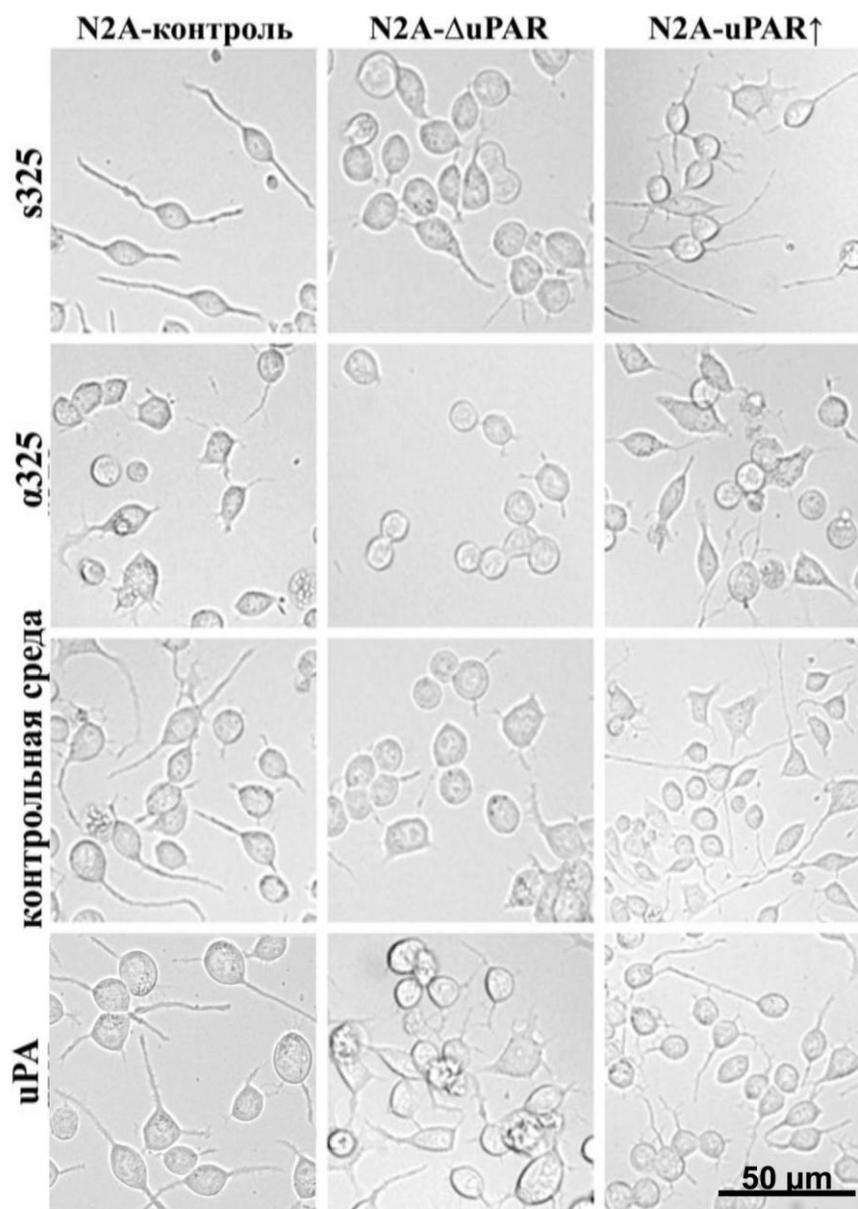


Рис. 25. Микрофотографии клеток N2A с гиперэкспрессией uPAR↑, с подавленной экспрессией ΔuPAR и контрольные клетки, культивированные на фибронектине в течение 72 часов в контрольной среде или после добавления пептида α325, блокирующего взаимодействие uPAR-α5β1-интегринов, или контрольного пептида s325, или uPA.

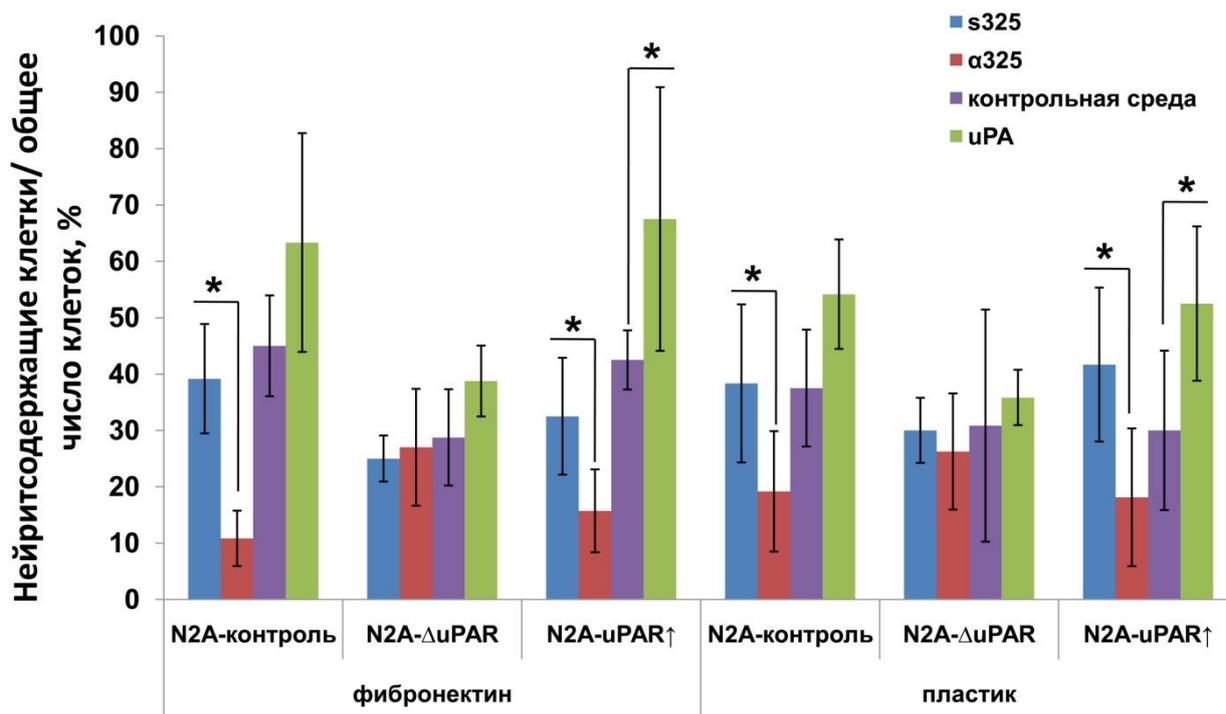


Рис. 26. Количественная оценка нейритсодержащих клеток в культуре N2A в условиях культивирования в контрольной среде или после добавления пептида $\alpha 325$, блокирующего взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами, или контрольного пептида s325, или uPA, на фибронектине или на непокрытом пластике. Представлено отношение количества клеток, содержащих нейриты, к общему числу клеток. s325 – контрольный пептид, $\alpha 325$ – разобщающий пептид, uPA – урокиназа. 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.

Чтобы подтвердить, что uPAR напрямую взаимодействует с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами в клетках N2A, мы провели реакцию совместной иммунопреципитации uPAR и $\alpha 5$ -интегрина, добавляя в среду культивирования клеток разобщающий пептид $\alpha 325$ (100 нМ), который вызывал блокирование взаимодействия uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами и нарушение нейритогенеза, или контрольный пептид s325.

Клетки N2A (WT и uPAR \uparrow) культивировали до достижения монослоя, далее в среду культивирования добавляли пептиды α 325 или s325. Клетки лизировали и анализировали ко-иммунопреципитацию uPAR и α 5-интегрина, используя антитела к α 5-интегрину. Как в WT клетках, так и в клетках uPAR \uparrow взаимодействие uPAR- α 5-интегрин блокировалось в присутствии разобщающего пептида α 325, но не контрольного s325 (Рис. 27). Введение пептида α 325 приводило к снижению содержания uPAR в лизатах, полученных из клеток WT и uPAR \uparrow , в 4,2 и 5 раз соответственно (n=3, p<0,05). В тех же условиях α 325 пептид приводил к снижению содержания α 5-интегрина в клетках WT и uPAR \uparrow в 2,4 и 3 раза соответственно (n=3, p<0,05) [134]. Эти результаты подтверждают прямое взаимодействие uPAR с α 5-интегрином в клетках N2A.

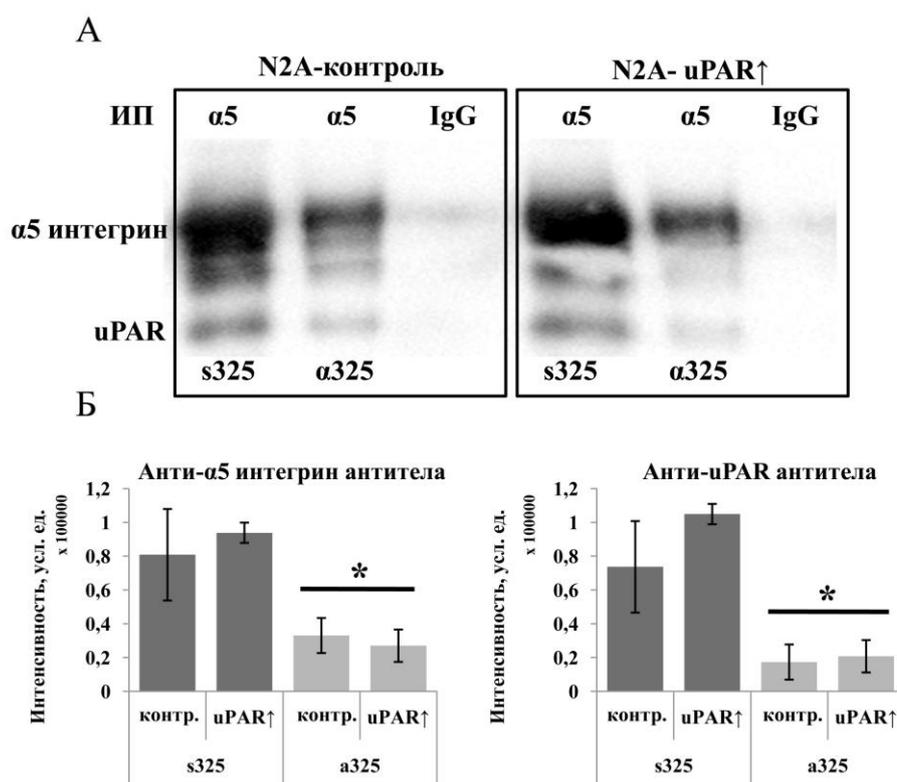


Рис.27. Анализ изменения содержания uPAR и α 5-интегрина в иммунопреципитатах клеток N2A (WT и uPAR \uparrow) после обработки разобщающим пептидом α 325 с использованием метода Вестерн-блоттинга (А) с последующей денситометрией (Б). ИП – антитела, используемые для

реакции ко-иммунопреципитации, $\alpha 325$ - блокирующий пептид, $s325$ – контрольный пептид. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=3$, $*p < 0,05$, Т-тест.

Создание эксплантной модели для изучения хемотактических свойств uPAR.

В экспериментах, описанных ранее, мы наблюдали эффекты мембранно-заякоренного uPAR, который, стимулирует рост аксонов и регулирует их траекторию, влияет на регенерацию периферических нервов. Однако известно, в эмбриогенезе и при регенерации аксоны растут по градиенту хемоаттрактантов и растворимых факторов роста [143, 144]. Также из данных литературы известно, что существуют растворимые формы uPAR, способные стимулировать хемотаксис клеток [63]. Чтобы изучить хемотактические свойства uPAR мы разработали модель для анализа направленного роста нейритов *ex vivo* [145]. Для этого мы выделяли спинальные ганглии (СГ) мыши и помещали в каплю Матригеля. Для анализа возможного стимулирующего действия uPA или uPAR на рост нейритов от СГ в Матригель до полимеризации вносили клетки НЕК293, трансфицированные плазмидами, содержащими кДНК для экспрессии мышинных uPA или uPAR, или нетрансфицированные НЕК293 в качестве контроля. Матригель с клетками помещали по одну сторону от СГ для создания градиента концентрации исследуемых белков, другая сторона Матригеля без клеток являлась контрольной [133] (Рис. 28). Для анализа роста нейритов площадь Матригеля с ганглием и отрастающими от него нейритами делили на 2 части так, чтобы в одной части был Матригель с клетками, в другой – контрольная сторона Матригеля без клеток (Рис. 29). На 7 день оценивали относительную площадь: считали общую площадь, занимаемую ганглием и отрастающими от него нейритами, нормируя ее на площадь СГ.

Трёхмерная модель эксплантов спинальных ганглий
мышы в матригеле.
Навигационная модель *ex vivo*

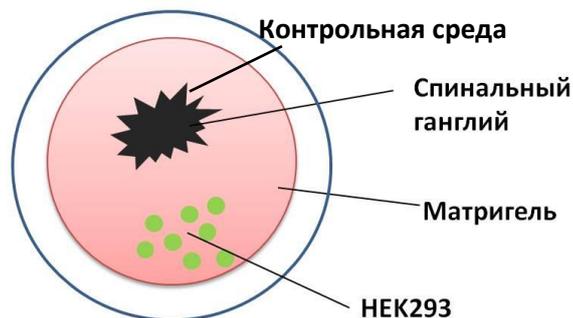


Рис. 28. Схема, иллюстрирующая расположение СГ и клеток в трёхмерной модели эксплантов в Матригеле.

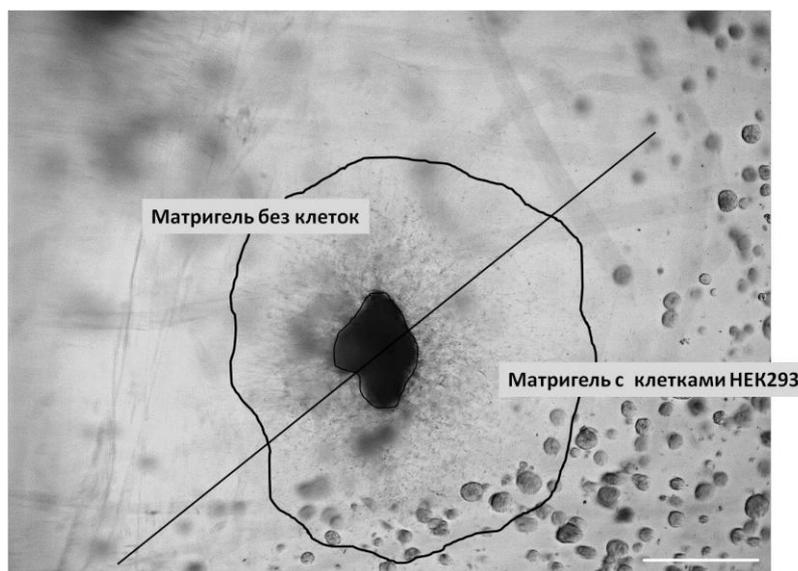


Рис. 29. Схема анализа площади, занимаемой отрастающими нейритами. Площадь спинального ганглия с нейритами условно делили на 2 части так, чтобы в одной части был Матригель с клетками, в другой – контрольная сторона Матригеля без клеток. Масштабный отрезок 250 мкм.

В эксперименте использовали СГ от контрольных (WT) мышей. Мы обнаружили, что площадь, занимаемая отрастающими нейритами от СГ в сторону Матригеля с нетрансфицированными клетками, достоверно больше площади нейритов с контрольной стороны Матригеля (18.3 ± 7.2 отн. ед. против 10.12 ± 3.4 отн. ед., $p=0.01$). Таким образом, мы разработали

адекватную модель для анализа направленного роста нейритов, позволяющую оценивать стимулирующее воздействие веществ, секретлируемых клетками в среду культивирования.

uPAR регулирует траекторию роста нейритов в отсутствие uPA.

Далее мы анализировали характер и направление роста нейритов от СГ, полученных от мышей WT и uPA^{-/-} в Матригеле, в который вводили клетки НЕК293, экспрессирующие растворимые uPA и uPAR. Оказалось, что uPAR обладает хемотактическим действием, даже в отсутствие своего лиганда (uPA). Введение клеток НЕК293, трансфицированных uPA (НЕК293-uPA) для секреции урокиназы в среду, в Матригель с СГ от контрольных и uPA^{-/-} мышей стимулировало рост нейритов именно в направлении локализации этих клеток: площадь, занимаемая отрастающими нейритами в сторону клеток НЕК293-uPA, экспрессирующих урокиназу, у WT ганглиев составила 17.5 ± 0.9 отн.ед., а площадь роста нейритов в контрольную сторону (Матригель без клеток) составила $9,4 \pm 0,55$ отн.ед., ($p < 0.001$). В Матригеле с СГ от uPA^{-/-} мышей площадь роста нейритов, растущих в сторону клеток НЕК293-uPA составляла 17.7 ± 0.08 отн. ед., а в контрольную сторону - 14.2 ± 0.68 отн. ед., $p < 0.05$ (Рис. 30).

Ведение в Матригель клеток НЕК293, трансфицированных uPAR (НЕК293-uPAR), приводило к увеличению площади, занимаемой нейритами, в направлении клеток, экспрессирующих uPAR, по сравнению с контрольной стороной. Такой характер роста наблюдался в культуре СГ, полученных как от WT мышей, так и от uPA^{-/-} мышей: площадь в направлении клеток НЕК293-uPAR в Матригеле с СГ от WT мышей составляла 21.9 ± 1.8 отн. ед, а в контрольную сторону 15.8 ± 2.9 отн. ед., $p < 0.001$; в Матригеле с СГ от uPA^{-/-} мышей площадь в направлении клеток НЕК293-uPAR составляла 22.3 ± 0.89 отн. ед, а в контрольную сторону - 13 ± 1.1 отн. ед., $p < 0,001$ (Рис. 30, 31).

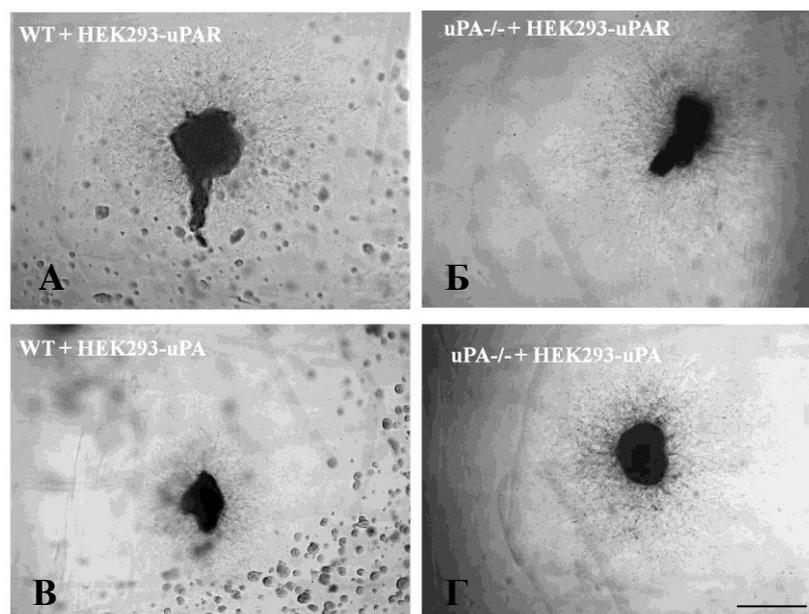


Рис. 30. Микрофотография спинальных ганглиев, полученные от WT и uPA^{-/-} мышей и культивируемых в капле Матригеля. Справа от ганглиев помещены клетки HEK293, секретирующие uPAR (А,Б) и uPA (В,Г). Масштабный отрезок 250 мкм

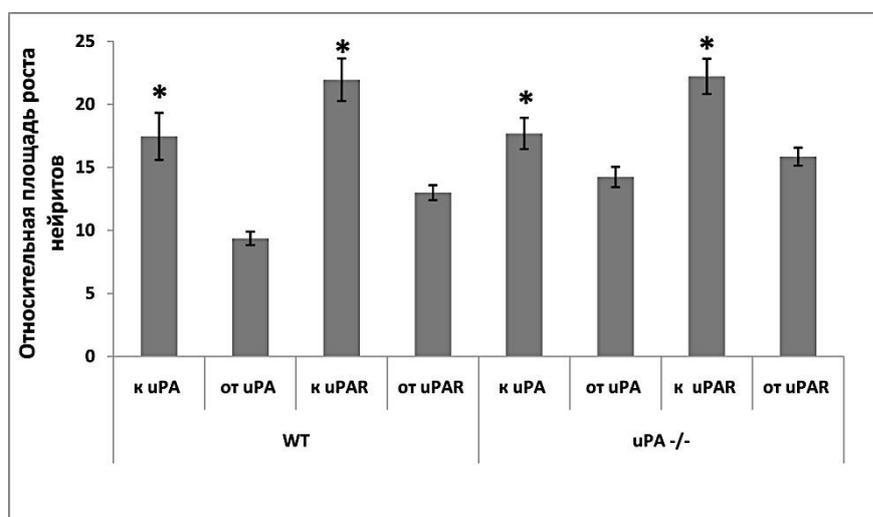


Рис. 31. Анализ относительной площади, занимаемой отрастающими от спинальных ганглиев нейритами и растущими по градиенту концентрации uPA и uPAR, которые секретируют HEK293 клетки, трансфицированные соответствующими генами. Ганглии были получены от WT и uPA^{-/-} мышей. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=3, p<0,05, ANOVA.

uPAR солокалίζεται с хемокиновым рецептором FPRL1 в нейронах.

Для выяснения механизма участия uPAR в регуляции направленного роста нейритов, мы выделяли первичную культуру нейронов из СГ, полученных от WT мышей, [133] и, с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания, оценивали экспрессию uPAR и хемокинового рецептора FPRL1. Методом конфокальной микроскопии мы обнаружили, что uPAR и FPRL1 экспрессируются как на конусе роста аксонов, так и в телах нейронов, выделенных из СГ, более того мы наблюдали солокализацию uPAR и рецептора хемокинов FPRL1 (Рис. 32).

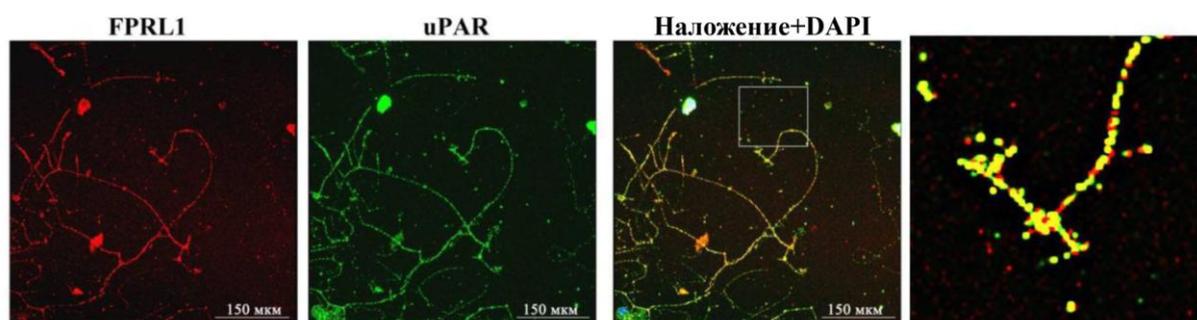


Рис. 32. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание первичной культуры нейронов мыши антителами к uPAR (зелёная флуоресценция) и FPRL1 (красная флуоресценция) на 3 сутки культивирования. uPAR и хемокиновый рецептор FPRL1 экспрессируются в нейронах СГ, включая конус роста аксонов. Кроме того, обнаруживается значительная солокализация uPAR и FPRL1 (желтая флуоресценция). Масштабный отрезок 150 мкм. На врезке справа - увеличенное изображение.

Растворимая форма uPAR (suPAR) обладает хемотактическими свойствами.

Для изучения способности suPAR стимулировать рост нейритов с участием хемокинового рецептора FPRL1 использовали СГ от uPAR^{-/-}

мышей, чтобы исключить эффекты эндогенного uPAR [133]. СГ высаживали в Матригель и после полимеризации слева и справа от СГ добавляли капли Матригеля, в которые дополнительно вносили следующие добавки: suPAR (1 нМ), пертуссис токсин (ПТ, 100 мкМ), блокирующий FPRL1, смесь ПТ и suPAR. Эксперимент включал 4 группы: 1 группа содержала Матригель с добавлением suPAR, 2 группа – Матригель с ПТ, 3 группа – Матригель с ПТ и suPAR, и 4 группа – ПТ с suPAR с одной стороны, и suPAR с другой стороны. Далее оценивали длину нейритов, растущих от СГ в сторону внесенных добавок.

При анализе полученных результатов в 1 группе оказалось, что длина нейритов, растущих в сторону suPAR, достоверно больше длины нейритов, растущих в сторону без добавок: $3,05 \pm 0,25$ отн.ед. против $1,87 \pm 0,57$ отн.ед., $p < 0.05$ (Рис. 33).

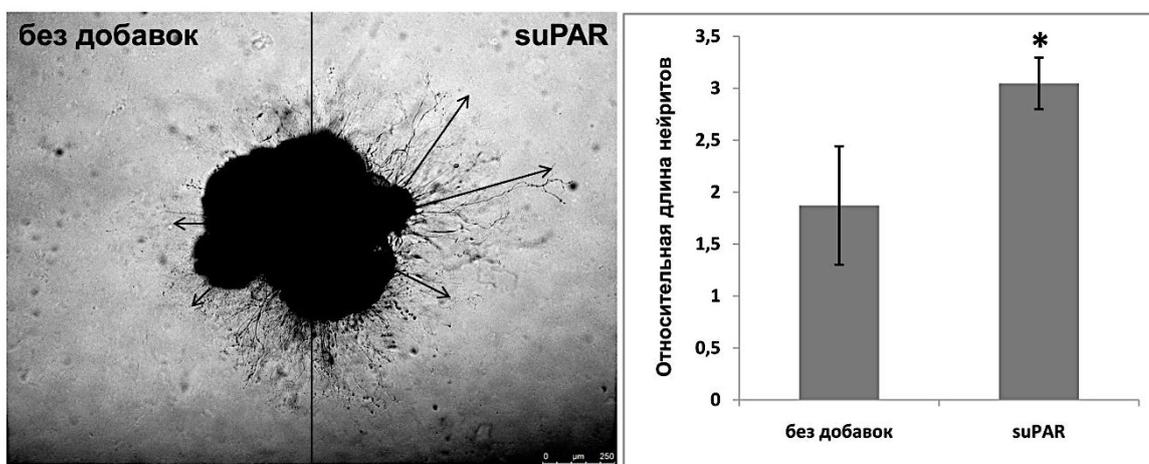


Рис. 33. Спинальный ганглий uPAR-/- мыши, помещенный в каплю Матригеля. На микрофотографии справа от СГ нанесена капля Матригеля с suPAR, слева - капля Матригеля без добавок (контроль). Стрелками обозначено направление роста нейритов. Масштабный отрезок 250 мкм. На графике представлен анализ относительной длины нейритов, растущих от СГ по градиенту концентрации suPAR, по сравнению с контрольной стороной. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, * $p < 0.05$.

Длина нейритов, растущих в сторону ПТ (2 группа), была достоверно меньше длины нейритов, растущих в сторону Матригеля без добавок: $1,57 \pm 0,42$ отн.ед. против $2,63 \pm 0,49$ отн.ед., $p < 0.05$ (Рис. 34). Полученные результаты подтверждают предположение об участии рецептора хемокинов FPRL1 в регуляции направленного роста нейритов, так как добавление токсина, блокирующего $G\alpha_i$ -субъединицу G-белка, ассоциированного с FPRL1, нарушает рост нейритов.

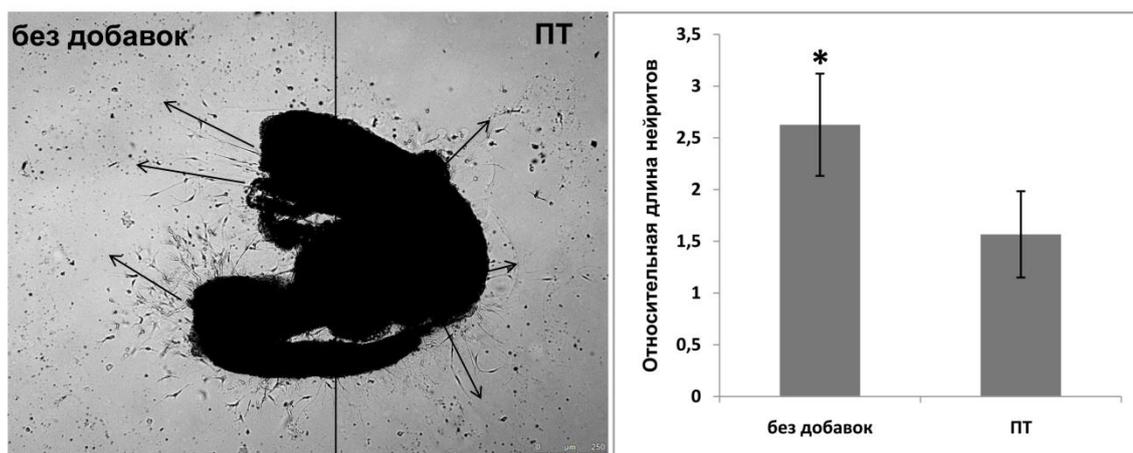


Рис. 34. Спинальный ганглий uPAR^{-/-} мыши, помещенный в каплю Матригеля. На микрофотографии справа от СГ нанесена капля Матригеля с ПТ, слева - контрольная сторона без добавок. Стрелками обозначено направление роста нейритов. Масштабный отрезок 250 мкм. На графике представлен анализ относительной длины нейритов, растущих от СГ в сторону нанесения ПТ по сравнению с контрольной стороной. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $*p < 0.05$.

В группе 3 при добавлении с одной стороны suPAR, а с другой ПТ обнаружено, что длина нейритов, растущих в сторону suPAR достоверно больше, чем длина нейритов, растущих в сторону ПТ: $2,5 \pm 0,47$ отн.ед. против $1,14 \pm 0,12$ отн.ед., $p < 0.05$ (Рис. 35).

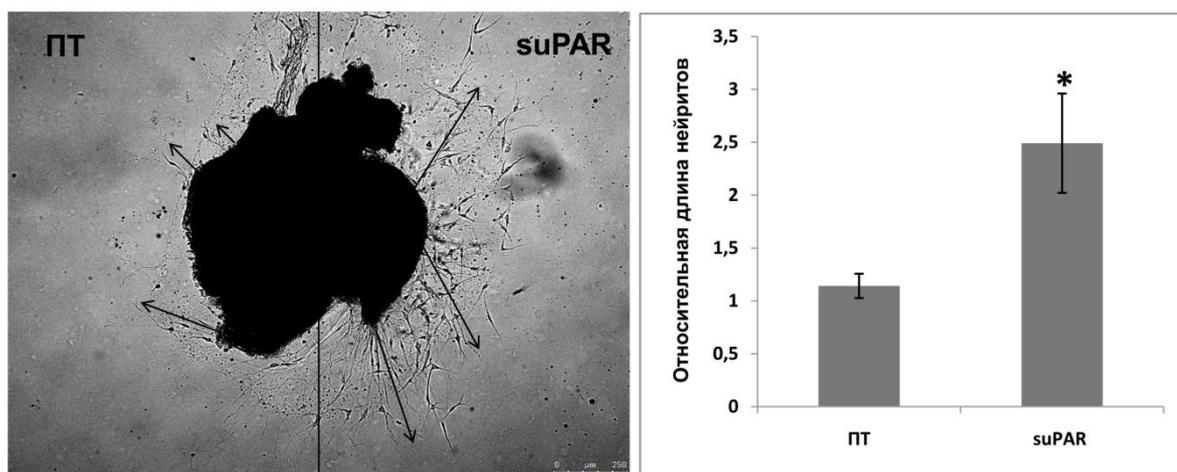


Рис. 35. Спинальный ганглий uPAR^{-/-} мыши, помещенный в каплю Матригеля. На микрофотографии справа от СГ нанесена капля Матригеля с suPAR, слева – капля с ПТ. Стрелками обозначено направление роста нейритов. Масштабный отрезок 250 мкм. На графике представлен анализ относительной длины нейритов, растущих от СГ по градиенту концентрации suPAR по сравнению нейритами, растущими в сторону нанесения ПТ. Данные представлены как среднее±стандартное отклонение, * $p < 0.05$.

В группе 4 совместное введение suPAR и ПТ приводило к достоверному уменьшению длины нейритов по сравнению с suPAR ($1,1 \pm 0,3$ против $2,0 \pm 0,22$ отн.ед., $p < 0.05$) (Рис. 36). Эти данные свидетельствуют о том, что блокирование хемокинового рецептора FPRL1 с использованием ПТ снижает стимулирующее влияние suPAR на рост нейритов. Так как мы показали солокализацию uPAR и FPRL1 на конусе растущего аксона, то в совокупности эти данные позволяют предположить, что стимулирующее влияние suPAR на рост нейритов реализуется через хемокиновый рецептор FPRL1 [133].

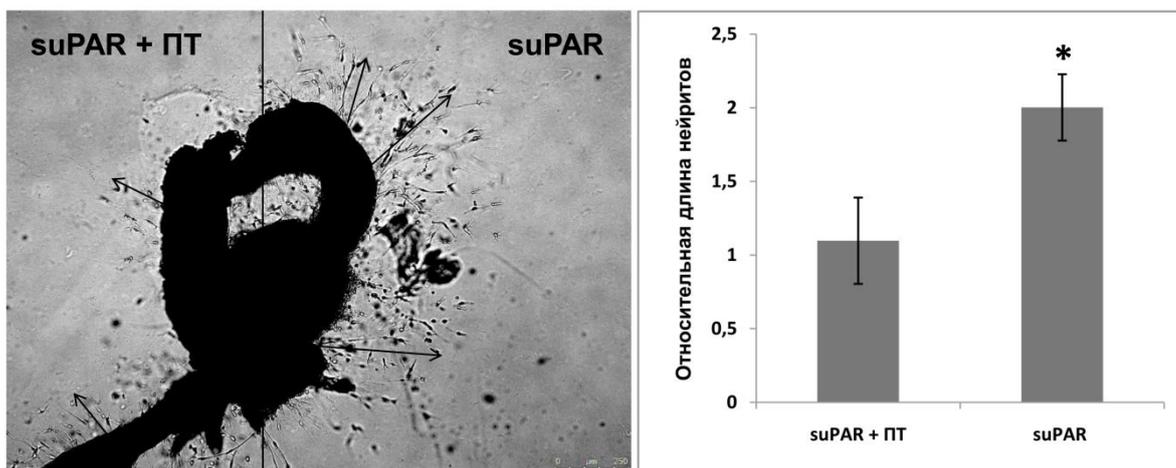


Рис. 36. Спинальный ганглий uPAR-/- мыши, помещенный в каплю Матригеля. На микрофотографии справа от СГ нанесена капля Матригеля с suPAR, слева – капля Матригеля, содержащего смесь ПТ и suPAR. Стрелками обозначено направление роста нейритов. Масштабный отрезок 250 мкм. На графике представлен анализ относительной длины нейритов, растущих от СГ по градиенту концентрации suPAR по сравнению с совместным введением ПТ и suPAR. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, * $p < 0.05$.

*при работе над данным разделом диссертации использованы следующие публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

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. 1–1. 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. 1. 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. IF (WoS) = 4.522.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В различных исследованиях было показано, что урокиназная система активируется при повреждении органов и тканей и играет важную роль в процессах регенерации [63]. Взаимодействие урокиназы с uPAR активирует плазмин и способствует деградации поврежденного внеклеточного матрикса, что модулирует адгезию клеток и облегчает процессы миграции и инвазии [62, 82]. В дополнение к известной роли урокиназного рецептора во внеклеточном протеолизе, были обнаружены функции uPAR, связанные с активацией внутриклеточной сигнализации путем латерального взаимодействия uPAR с другими рецепторами на поверхности клетки. Сигнализация с участием uPAR может вызывать реорганизацию цитоскелета, регулировать миграцию и пролиферацию клеток и приводить к ремоделированию тканей [15]. Все эти процессы в совокупности влияют на восстановление органов и тканей после повреждения.

Данные, указывающие на участие урокиназы и её рецептора в формировании нервной системы и регенерации нервов, появились около 30 лет назад, тем не менее, работы, посвященные изучению этих процессов, остаются малочисленными. Известно, что в развивающейся нервной системе uPA и uPAR экспрессируются в эмбриогенезе в мигрирующих клетках нервного гребня, гранулярных клетках мозжечка, астроцитах, симпатических и сенсорных нейронах и регулируют миграцию, пролиферацию, выживаемость нервных клеток [133]; изменения в экспрессии uPA/uPAR или полиморфизмы их генов приводят к нарушению развития структур головного мозга и расстройству когнитивных функций [146-148]. Так, изменения экспрессии uPA и uPAR ассоциированы с развитием эпилепсии (как у животных, так и у людей), аутизма, рассеянного склероза, деменции, энцефалита, опухолей ЦНС [146, 147]. Нокаут гена, кодирующего uPAR мыши, вызывает практически полную потерю парвальбуминовых интернейронов в процессе развития ЦНС. В последствии это приводит к

повышенной судорожной активности, склонности к эпилепсии, тревожности и нарушению социальных взаимодействий [147]. Авторы исследования предположили, что одним из возможных механизмов развития заболеваний при снижении экспрессии uPAR или при полиморфизмах в его гене может быть нарушение связей между нейронами, так как при гистологическом анализе срезов головного мозга наблюдалось снижение формирования синаптических связей. [146, 147] Схожие данные были получены на модели развивающейся ЦНС куриных эмбрионов, в которых экспрессия uPAR обнаруживалась на поверхности нейронов, и в особенности на конусах роста нейритов. При этом экспрессия uPAR была максимальной в мигрирующих нейронах, а также в клетках, в которых протекал нейритогенез и синаптогенез [149]. Во взрослом организме uPA и uPAR экспрессируется в ПНС на поверхности тел и аксонов сенсорных нейронов, а также в Шванновских клетках [8, 142, 148, 150].

Из литературы известно, что экспрессия uPAR повышается в первые часы после травмы ЦНС и ПНС, а на моделях *in vivo* обнаружено, что подавление экспрессии uPA и uPAR приводит к задержке восстановления нервов как в ПНС, так и в ЦНС [7, 8, 142, 151]. Данные, указывающие на важность взаимодействия uPA с uPAR при регенерации ЦНС были получены на модели ишемического инсульта при изучении его последствий в коре головного мозга мыши. Во-первых, было показано, что в аксонах нейронов в области ишемического повреждения повышается экспрессия uPAR. Во-вторых, нокаут генов, кодирующих uPA и uPAR, у мышей нарушает функциональное восстановление ЦНС после ишемического инсульта. У uPA^{-/-} и uPAR^{-/-} мышей гемипарез наблюдался более месяца после инсульта, в то время как в контрольной группе двигательная функция конечности восстанавливалась на 15 сутки [151]. При этом экзогенное введение uPA в зону инсульта улучшало неврологический статус мышей, нокаутных по uPA, но не нокаутных по uPAR. При дальнейшем анализе с использованием метода окрашивания коры головного мозга по Гольджи было показано, что

именно взаимодействие uPA с uPAR активировало перестройку актинового цитоскелета и образование филоподий в дендритах и не зависело от протеолитической активности uPA [152].

В ПНС на модели аксотомии лицевого нерва у крыс показано, что экспрессия урокиназы повышалась в первые часы после травмы и достигала пика спустя 3-5 суток. При этом протеолитическая активность урокиназы наблюдалась как на поверхности тел нейронов, так и на мембране аксонов регенерирующих мотонейронов и стимулировала рост и миелинизацию регенерирующего нерва [153, 154].

Зависимость между протеолитической активностью uPA, составом ВКМ и регенерацией нерва была обнаружена при исследовании биопсий периферических нервов пациентов, страдающих различными видами нейропатий [142]. Несмотря на полученные данные об участии урокиназной системы в регенерации, на данный момент механизмы влияния uPAR/uPA на регенерацию нервов в ПНС остаются мало изученными.

Чтобы выяснить роль uPA и ее рецептора uPAR в восстановлении периферических нервов, мы оценили электрофизиологические и морфологические параметры регенерации периферических нервов. Для этого использовали мышей, нокаутных по генам uPA и uPAR и *in vivo* модель пережатия малоберцового нерва.

Мы оценили такие электрофизиологические показатели, как амплитуда СПДН и латентный период. Известно, что снижение амплитуды СПДН связано с уменьшением количества аксонов большого диаметра, а удлиненный латентный период отражает снижение скорости проводимости нерва из-за задержки повторной миелинизации (ремиелинизации) нерва после травмы [128, 136, 155]. В наших экспериментах у uPAR^{-/-} мышей наблюдалось статистически значимое удлинение латентного периода (7-й день) и уменьшение амплитуды СПДН (14-й день) после травмы нерва (Рис. 11, 12) по сравнению с WT и uPA^{-/-} мышами и коррелировало с 2-4-кратным

уменьшением числа NF200-положительных аксонов большого диаметра в регенерирующих нервах (рис. 13, 14). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что именно uPAR критически важен как для регенерации периферических нервов после повреждения, так и для ремиелинизации, что совпадает с данными, полученными на моделях регенерации после повреждения в ЦНС [151].

Дезинтеграция нервных волокон, как известно, является первой стадией сразу после повреждения периферического нерва, за которой следует Валериановская дегенерация в дистальной части поврежденного нерва. ШК, окружающие место повреждения, теряют контакт с аксоном, трансдифференцируются и начинают снова экспрессировать GFAP, что характерно для незрелых эмбриональных ШК [3, 28, 138]. ШК пролиферируют и мигрируют, образуя полосы Бюнгнера, обеспечивающие путь для регенерации аксонов. Позднее ШК повторно дифференцируются и ремиелинизируют регенерирующие аксоны [45]. Наши данные по снижению числа Ki-67 и GFAP двойных позитивных клеток у uPAR^{-/-} мышей указывают на то, что у этих мышей нарушена пролиферация ШК (Рис. 15, 16). Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что нокаут uPAR оказывает негативное влияние не только на регенерацию аксонов, но и на пролиферацию ШК и последующую ремиелинизацию.

Полученные электрофизиологические и морфологические данные о задержке регенерации общего малоберцового нерва у uPAR^{-/-} мышей (Рис. 11-16) коррелируют с ранее опубликованным результатом о нарушении восстановления седалищного нерва у uPAR^{-/-} мышей [142]. Ривеллини и соавторы связывают нарушение восстановления нерва у uPAR^{-/-} мышей со сниженной протеолитической активностью uPA [142]. Однако наши данные показывают, что анализируемые параметры восстановления нервов у uPA^{-/-} мышей не отличаются от WT мышей, что ставит под сомнение необходимость именно uPA в регенерации *n. Peroneus communis* или

предполагает иной механизм участия урокиназной системы. Эти результаты можно объяснить uPA-независимой функцией uPAR в нервной системе, который может взаимодействовать с другими лигандами и мембранными рецепторами (витронектин, Endo180, интегрины и SRPX2) [12, 88, 146, 149, 156]. Непротеолитическая роль урокиназной системы в нейритогенезе и миграции нейронов была продемонстрирована в экспериментах на модели развития ЦНС с использованием эксплантной культуры куриных эмбрионов [149]. Под воздействием экзогенной uPA формировались активные конусы роста аксонов, в которых происходила перестройка цитоскелета с образованием филоподий и ламеллоподий, обусловленная ассоциацией микротрубочек с фибриллярным актином. Площадь, занятая конусами роста и филоподиями, была выше у нейронов, обработанных uPA [149]. При этом экзогенно введенная uPA стимулировала формирование нейритов, а их длина была прямо пропорциональна концентрации урокиназы. Кроме того, добавление uPA стимулировало миграцию нейронов в развивающейся ЦНС, увеличивая её почти в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Основным механизмом, опосредующим наблюдаемый эффект, являлось специфичное связывание uPA с uPAR. При экзогенном введении uPA и последующим иммунофлуоресцентном окрашивании нейронов наблюдалось увеличение уровня фосфорилированной FAK в нейритах и на конусах роста аксонов (в особенности в ламеллоподиях). Это сопровождалось перестройкой актинового цитоскелета на конусе роста [149]. Таким образом, был показан независимый от протеолитической активности эффект uPA на миграцию нейронов в развивающейся ЦНС, обусловленный связыванием uPA с uPAR и передачей сигнала внутрь клетки [149]. Известно, что uPAR является ГФИ-заякоренным белком и может передавать сигналы внутрь клеток взаимодействуя с различными мембранными партнерами. Ранее на моделях *in vitro* было показано, что uPAR модулирует клеточную адгезию и миграцию, взаимодействуя с интегринными на мембране клеток. Взаимодействие между uPAR и субъединицами β -интегринов ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 6$)

было продемонстрировано на культурах фибробластов легких и линиях раковых клеток с использованием различных биохимических методов (Wei [10, 99, 105, 131]). Интегрины экспрессируются на поверхности всех клеток организма, в том числе и на нейронах и ШК [6]. При этом все типы нейронов на своей поверхности несут β 1-интегрины [6]. Мотонейроны преимущественно экспрессируют α 3, α 7 и α 6 субъединицы интегринов, а чувствительные нейроны – α 1, α 5, α 6 и α 7 [6, 109]. На поверхности нейронов, аксоны которых образуют ПНС у млекопитающих, полностью отсутствует экспрессия α 2, α 8, α 9, α 10, α 11, β 2, β 3, β 5, β 6 и β 7-субъединиц интегринов, а уровни экспрессии α 4 и β 4-субъединиц крайне низки [157].

Известно, что повреждение периферических нервов сопровождается повышением экспрессии некоторых типов субъединиц интегринов (β 1, α 4- α 7) [141, 158, 159]. Подавление с помощью ингибиторных пептидов функций таких субъединиц интегринов, как α 5, α 7 и β 1 в ПНС млекопитающих практически полностью подавляло рост регенерирующих аксонов [160]. При этом α 5 β 1-интегрины экспрессировались в большом количестве на поверхности ганглионарных нейронов, а также на аксолеммe конусов роста [141, 159, 161]. Было показано, что уровень экспрессии α 5-субъединиц в аксонах нейронов увеличивался в 2 раза спустя 2 дня после повреждения седалишного нерва; к 7-му дню экспрессия возвращалась к исходному уровню до повреждения [162, 163]. Положительное влияние α 4 β 1- и α 5 β 1-интегринов, рецепторов фибронектина, на регенерацию аксонов получило подтверждение и в экспериментах *in vitro*. Клетки линии PC12 (клетки феохромоцитомы), дифференцированные в нейроны *in vitro*, характеризовались медленным ростом на фибронектине и практически не экспрессировали α 4 β 1- и α 5 β 1-интегрины. Эктопическая экспрессия α 4-субъединицы приводила к значительному увеличению скорости роста нейритов (в 2,5 раза) [159]. Гиперэкспрессия α 5 β 1-интегринов в культуре ганглионарных нейронов, культивируемых на фибронектине, также вызывала трёхкратное увеличение скорости нейритогенеза [164].

В эмбриогенезе сигнальные каскады, запускаемые при связывании урокиназы с рецептором в процессе нейритогенеза, опосредованы связыванием uPAR с интегринами [149]. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания куриных эмбрионов E7 стадии развития было показано, что экспрессия $\alpha\beta 1$ - и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов и uPAR значительно повышалась в нейритах и на конусах роста нейронов, обработанных uPA, по сравнению с контролем [149]. При этом наблюдалась солокализация uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринными. Более того, результаты иммунопреципитации подтвердили специфичное взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринными в развивающейся ЦНС [149]. Функциональным эффектом такого связывания являлась активация ФАК-сигнального каскада в нейронах. Во взрослой ЦНС после травмы связывание uPA с uPAR индуцирует изменение конформации $\beta 1$ -интегринна, приводящее к внутриклеточной передаче сигналов через малые ГТФазы и регенерации аксонов [151]. Таким образом, эти ранее опубликованные данные, указывают на важность взаимодействия uPAR с интегринными и их совместное функционирование при регенерации нервов.

При выяснении механизма, по которому uPAR влияет на регенерацию нервов мы обнаружили повышение содержания uPAR в интактных и травмированных *n. Peroneus communis* у uPA-/- мышей по сравнению с WT мышами (Рис. 17-20). Можно предположить, что в отсутствие урокиназы повышается экспонирование uPAR на клеточной мембране из-за нарушения интернализации самого рецептора, который в норме эндоцитируется в комплексе uPA/uPAR/PAI-1/LRP. Известно, что данный комплекс не образуется в отсутствие uPA [72, 94]. Возможен и компенсаторный механизм, который реализуется за счет взаимодействия uPAR с латеральными партнерами, такими как интегринны. Увеличение экспрессии uPAR в интактных нервах uPA-/- мышей не приводило к повышению экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов, в то время как нокаут урокиназного рецептора

приводил к снижению экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в интактных нервах по сравнению с WT или uPA-/- мышами.

При травме нерва была обнаружена еще большая экспрессия uPAR и в проксимальном и в дистальном отделах регенерирующих нервов у uPA-/- мышей. При этом мы наблюдали увеличение как экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов, так и их солокализации с uPAR по сравнению с WT мышами (Рис. 21, 22). Это может объяснять сходную скорость регенерации у нокаутных по урокиназе и контрольных мышей. Аналогичные результаты мы получили и на *ex vivo* модели: площадь роста нейритов из СГ, полученных от uPA-/- мышей, была больше по сравнению с контролем. В совокупности полученные результаты позволяют предположить, что на поверхности регенерирующих аксонов происходит сборка комплекса uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины, имеющего функциональное значение в восстановлении нервов после травмы.

Чтобы подтвердить это предположение, мы использовали ранее описанную N2A-клеточную модель нейритогенеза *in vitro* [129]. При иммунофлуоресцентном окрашивании клеток мы наблюдали повышенную экспрессию и солокализацию uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами на мембране uPAR \uparrow клеток, в то время как в uPAR \downarrow клетках экспрессия $\alpha 5\beta 1$ -интегринов снижалась (Рис. 24). Статистически значимой разницы между клетками, культивированными на фибронектине или на непокрытом пластике, не наблюдалось, по-видимому, потому что клетки успевают синтезировать фибронектин в течение 72 часов культивирования. На клеточных культурах некоторых линий нейробластомы мыши продемонстрировано, что клетки синтезируют фибронектин в течение первых 24 часов культивирования [165].

Повышенная солокализация uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегринов коррелировала с увеличением числа клеток, способных давать нейриты в uPAR-экспрессирующих культурах (uPAR \uparrow и контрольных клетках) в ответ на

введение экзогенной uPA (Рис. 25, 26). В более ранних работах сообщалось, что uPA (или ее аминотерминальный фрагмент АТФ), связанная с uPAR, может индуцировать опосредуемую кавеолином-1 транслокацию $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в липидные плоты и активировать интегрин-зависимую внутриклеточную сигнализацию (FAK, Src, EGFR, MAPK). Наши результаты, полученные на линии клеток N2A соответствуют вышеуказанным данным и предполагают, что uPA может стимулировать сборку комплекса uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины на поверхности клеток и стимулировать нейритогенез, поскольку введение пептида $\alpha 325$, блокирующего взаимодействие uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины, ингибирует формирование нейритов. $\alpha 325$ пептид, гомологичный внеклеточному домену α - субъединицы интегрин, нарушает взаимодействие uPAR- $\alpha 5\beta 1$ -интегрины либо путем изменения конформации интегрин, либо путем конкуренции за сайт связывания на uPAR [113, 131].

$\alpha 5\beta 1$ -интегрины входят в число интегринов, распознающих RGD мотив в III домене фибронектина [166][105]. Было показано, что uPAR может непосредственно взаимодействовать с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами, что приводит к конформационному изменению внеклеточных доменов интегринов и образованию дополнительного сайта связывания интегринов с фибронектином в домене НерII, который является RGD-независимым [105, 131]. На клетках фибросаркомы было показано, что uPAR требуется для активации $\alpha 5\beta 1$ -интегринов и сигнализации, инициированной взаимодействием клетки с доменами НерII и RGD фибронектина [105]. Возможно, данный механизм реализуется в дифференцированных клетках N2A, где взаимодействие uPAR с интегринными модулирует клеточную адгезию и приводит к формированию нейритов. Эти данные также согласуются с нашими результатами о роли uPAR в нейритогенезе на модели СГ *ex vivo*: блокирование uPAR специфическими антителами нарушало рост аксонов из СГ и изменяло траекторию их роста, что приводило к появлению aberrантных закрученных структур [129].

Из данных литературы известно, что не только мембранный uPAR обладает биологической активностью и способен латерально взаимодействовать с мембранными рецепторами, активируя сигнализацию. Показано, что фосфолипазы, плазмин и активная uPA способны расщеплять мембранно-связанный uPAR и тем самым приводить к появлению растворимых форм uPAR (suPAR) [63]. Показано, что растворимая форма suPAR может стимулировать хемотаксис клеток в отсутствие uPA [9]. В настоящей работе показано, что рекомбинантная форма suPAR стимулирует рост нейритов из эксплантов СГ в Матригель по градиенту концентрации как у WT, так и у uPA-/- мышей [133]. Градиент suPAR был создан за счет введения в Матригель клеткок НЕК293, которые стабильно экспрессировали плазмиду, содержащую кДНК uPAR мыши. Рецепторами, опосредующим suPAR-зависимый хемотаксис, являются рецепторы хемокинов – трансмембранные семидоменные рецепторы, ассоциированные с G-белками [79, 133]. К этому семейству рецепторов принадлежат FPRL1, FPR2 и FPRL3. Эти рецепторы способны взаимодействовать с N-формилированными пептидными лигандами, например с fMLP [167]. suPAR способен связываться с FPRL1 рецептором за счет линкерной области между доменами D2D3 [90]. Было показано, что suPAR, секретиретируемый нейтрофилами, связываясь с FPRL1 на мембране моноцитов человека активирует этот семидоменный рецептор [167, 168]. При этом запускается мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных депо и активируются Erk-киназы, что стимулирует хемотаксис клеток по градиенту suPAR [90]. Мы показали, что как uPAR, так и FPRL1 экспрессируются как в теле нейронов, так и на конусе роста и солокализуются при этом [133]. В настоящей работе впервые показаны хемотактические свойства suPAR при регенерации нейритов. Мы предполагаем, что данный эффект реализуется через рецептор FPRL1, так как добавление токсина, блокирующего $G\alpha_i$ -субъединицу G-белка, ассоциированного с FPRL1, подавляет нейритогенез (Рис. 32-35).

Вместе полученные результаты показывают, что именно uPAR, а не uPA, необходим для эффективного восстановления периферических нервов после травмы *in vivo* и регенерации аксонов *ex vivo*. Взаимодействие uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов важно для нейритогенеза *in vitro*, поскольку разобщающий пептид $\alpha 325$ ингибирует формирование нейритов в uPAR-экспрессирующих клетках (контрольные и uPAR \uparrow клетки) как на фибронектине, так и на непокрытом пластике. uPA стимулирует формирование нейритов только в клетках, экспрессирующих uPAR (контроль и uPAR \uparrow), но не в uPAR \downarrow клетках, что указывает либо на uPAR-опосредованный протеолитический механизм, либо, что более вероятно, на активацию сигнализации, приводящей к изменению клеточной адгезии и формированию нейритов *in vitro*. Также нами продемонстрированы хемотактические функции компонентов урокиназной системы: отрастающие от ганглиев нейриты растут по градиенту растворимых форм uPA и suPAR [133]. Более того, мы показали, что растворимая форма урокиназного рецептора проявляет собственные хемотактические свойства в отсутствие активной uPA. Мы предполагаем, что механизмом участия suPAR в регуляции направленного роста нейритов является его взаимодействие с рецептором FPRL1, который экспрессируется в теле и на конусе роста нейритов и солокализует при этом с uPAR. Эти данные раскрывают новые механизмы участия урокиназной системы в регуляции направленного роста и регенерации нервов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследованы механизмы участия урокиназной системы в формировании нейритов и в регенерации нервов после повреждения. При изучении регенерации периферического нерва *in vivo* мы обнаружили, что нокаут uPAR, но не uPA, приводит к задержке восстановления структуры и функции нерва. У мышей, нокаутных по гену uPAR, отмечались нарушения проводимости нерва (как в виде снижения

амплитуды СПДН, так и удлинения латентного периода), снижение количества аксонов в составе регенерирующих нервов и снижение числа пролиферирующих Шванновских клеток в регенерирующих нервах. При этом нокаут урокиназы на данной экспериментальной модели не оказывал значимого негативного влияния на регенерацию нерва. Следует отметить, что нокаут урокиназы у мышей приводил к компенсаторной реакции в виде увеличения экспрессии uPAR как в интактных нервах, так и в регенерирующих после экспериментального повреждения, что, предположительно, обеспечивало полноценную регенерацию.

На трехмерной модели регенерации аксонов спинальных ганглиев в Матригеле мы обнаружили, что блокирование урокиназы и урокиназного рецептора антителами приводит к практически полному нарушению радиального роста аксонов с возникновением характерных абберантных закрученных структур. При нокауте гена урокиназы отмечалось характерное увеличение площади, занимаемой отрастающими от СГ нейритами, что, возможно, было обусловлено повышенной экспрессией урокиназного рецептора, оказывающего стимулирующее действие на рост нейритов. Таким образом, в настоящей работе впервые обнаружены новые функции uPAR в нейритогенезе, независимые от присутствия урокиназы, а именно: uPAR регулирует ветвление и траекторию роста аксонов, а также стимулирует нейритогенез.

При изучении механизмов участия uPAR в регенерации нерва, мы обнаружили, что изменение экспрессии uPAR приводит к изменению экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов. Так, при нокауте uPAR экспрессия $\alpha 5\beta 1$ -интегринов в интактных нервах снижалась, а компенсаторное повышение экспрессии uPAR у uPA-/- мышей характеризовалось увеличением экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов и их солокализации с uPAR в регенерирующих после травмы периферических нервах.

Используя модель нейритогенеза на клетках N2A *in vitro*, мы подтвердили предположение о том, что экспрессия $\alpha 5\beta 1$ -интегринов зависит от экспрессии uPAR. Так, при подавлении экспрессии uPAR экспрессия $\alpha 5\beta 1$ -интегринов снижалась, а гиперэкспрессия рецептора приводила к повышению экспрессии $\alpha 5\beta 1$ -интегринов на плазматической мембране. Для доказательства прямого взаимодействия uPAR и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов мы использовали разобщающий пептид. Оказалось, что добавление пептида в среду культивирования и разобщение взаимодействия uPAR и интегринов нарушало нейритогенез именно в тех клетках, в которых присутствовал uPAR. Урокиназа также стимулировала нейритогенез только в клетках, в которых был экспрессирован uPAR. Эти данные подтверждают предположение о том, что uPAR необходим для реализации функций uPA, в то время как у рецептора урокиназы имеются свои собственные функции, независимые от урокиназы.

Вторым механизмом участия uPAR в регуляции нейритогенеза является обнаруженная нами в настоящей работе способность растворимой биологически активной формы suPAR стимулировать формирование и рост нейритов. Для изучения влияния suPAR на нейритогенез была разработана 3D эксплантная модель спинальных ганглиев в Матригеле, в который предварительно вводили клетки НЕК293, продуцирующие uPAR или uPA. Используя ингибиторный анализ с помощью коклюшного токсина (пертиусис токсина) мы показали, что хемотактические свойства suPAR обусловлены его взаимодействием с рецепторами, ассоциированными с G-белками. При окрашивании первичной культуры нейронов, выделенных из СГ, мы обнаружили, что uPAR экспрессируется в теле нейронов и на конусе роста аксонов и солокализуется при этом с рецептором хемокинов FPRL1, что позволяет предполагать, что uPAR стимулирует рост нейритов за счет взаимодействия с рецептором FPRL1.

Таким образом, в данной работе впервые обнаружены самостоятельные функции uPAR, независимые от присутствия uPA. Мы предполагаем, что uPAR является универсальным модулятором клеточных процессов, таких как адгезия, миграция и нейритогенез, и может функционировать как ко-рецептор других рецепторов и белков клеточной адгезии. uPAR является мультифункциональным белком, он опосредует протеолитические функции урокиназы и регулирует экспрессию интегринов. Сам uPAR после гидролиза (suPAR) может выступать в роли лиганда для рецепторов хемокинов и стимулировать направленный рост нейритов, обеспечивая тем самым полноценную регенерацию нервов после повреждения.

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 сококолизации 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wojtkiewicz D. M., Saunders J., Domeshek L., Novak C. B., Kaskutas V., Mackinnon S. E. Social impact of peripheral nerve injuries // *Hand (N Y)*. – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 161-7.
2. Allodi I., Udina E., Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level // *Prog Neurobiol*. – 2012. – Т. 98, № 1. – С. 16-37.
3. Namgung U. The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration // *Cells Tissues Organs*. – 2014. – Т. 200, № 1. – С. 6-12.
4. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration // . – 2009. – Т. 26, № 2. – С. E3.
5. Rubina K. A., Semina E. V., Tkachuk V. A. Guidance molecules and chemokines in angiogenesis and vascular remodeling // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 349-367.
6. Nieuwenhuis B., Haenzi B., Andrews M. R., Verhaagen J., Fawcett J. W. Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system // *Biol Rev Camb Philos Soc*. – 2018. – Т. 93, № 3. – С. 1339-1362.
7. Siconolfi L. B., Seeds N. W. Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush // *J Neurosci*. – 2001. – Т. 21, № 12. – С. 4348-55.
8. Siconolfi L. B., Seeds N. W. Induction of the plasminogen activator system accompanies peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush // *J Neurosci*. – 2001. – Т. 21, № 12. – С. 4336-47.
9. Blasi F., Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2002. – Т. 3, № 12. – С. 932-43.
10. Wei Y., Lukashev M., Simon D. I., Bodary S. C., Rosenberg S., Doyle M. V., Chapman H. A. Regulation of integrin function by the urokinase receptor // *Science*. – 1996. – Т. 273, № 5281. – С. 1551-5.

11. Degryse B. The urokinase receptor (uPAR) and integrins constitute a cell migration signalosome // *The cancer degradome – proteases in cancer biology* / Edwards D. и др. – New York: Springer, 2008. – С. 451-74.
12. Smith H. W., Marshall C. J. Regulation of cell signalling by uPAR // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – Т. 11, № 1. – С. 23-36.
13. Парфенова Е., Плеханова О., Меньшиков М., Степанова В., Ткачук В. Регуляция роста и ремоделирования кровеносных сосудов: уникальная роль урокиназы // *Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова.* – 2009. – Т. 95, № 5. – С. 442-464.
14. Gorrasi A., Li Santi A., Amodio G., Alfano D., Remondelli P., Montuori N., Ragno P. The urokinase receptor takes control of cell migration by recruiting integrins and FPR1 on the cell surface // *PLoS One.* – 2014. – Т. 9, № 1. – С. e86352.
15. Eden G., Archinti M., Furlan F., Murphy R., Degryse B. The urokinase receptor interactome // *Curr Pharm Des.* – 2011. – Т. 17, № 19. – С. 1874-89.
16. Grigoryan T., Birchmeier W. Molecular signaling mechanisms of axon-glia communication in the peripheral nervous system // *Bioessays.* – 2015. – Т. 37, № 5. – С. 502-13.
17. Glenn T. D., Talbot W. S. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury // *Curr Opin Neurobiol.* – 2013. – Т. 23, № 6. – С. 1041-8.
18. Castelnovo L. F., Bonalume V., Melfi S., Ballabio M., Colleoni D., Magnaghi V. Schwann cell development, maturation and regeneration: a focus on classic and emerging intracellular signaling pathways // *Neural Regen Res.* – 2017. – Т. 12, № 7. – С. 1013-1023.
19. Travis L. D. Histology Resources // *Journal of Electronic Resources in Medical Libraries.* – 2015. – Т. 12, № 2. – С. 126-133.

20. Barres B. A., Raff M. C. Axonal control of oligodendrocyte development // *J Cell Biol.* – 1999. – T. 147, № 6. – C. 1123-8.
21. Fredette B. J., Ranscht B. T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway // *J Neurosci.* – 1994. – T. 14, № 12. – C. 7331-46.
22. Kwon B. K., Liu J., Messerer C., Kobayashi N. R., McGraw J., Oschipok L., Tetzlaff W. Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – T. 99, № 5. – C. 3246-51.
23. Gonzalez-Perez F., Udina E., Navarro X. Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration // *Int Rev Neurobiol.* – 2013. – T. 108. – C. 257-75.
24. Stoll G., Muller H. W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights // *Brain Pathol.* – 1999. – T. 9, № 2. – C. 313-25.
25. Bodine-Fowler S. C., Meyer R. S., Moskovitz A., Abrams R., Botte M. J. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques // *Muscle Nerve.* – 1997. – T. 20, № 1. – C. 29-37.
26. Molander C., Aldskogius H. Directional specificity of regenerating primary sensory neurons after peripheral nerve crush or transection and epineurial suture A sequential double-labeling study in the rat // *Restor Neurol Neurosci.* – 1992. – T. 4, № 5. – C. 339-44.
27. Valero-Cabre A., Navarro X. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair // *J Neurotrauma.* – 2002. – T. 19, № 11. – C. 1475-85.
28. Waller A. V. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres // *Abstracts of the Papers Communicated to the Royal Society of London* –The Royal Society London, 1851. – C. 924-925.

29. Rishal I., Fainzilber M. Retrograde signaling in axonal regeneration // *Exp Neurol.* – 2010. – Т. 223, № 1. – С. 5-10.
30. Raivich G., Hellweg R., Kreutzberg G. W. NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration // *Neuron.* – 1991. – Т. 7, № 1. – С. 151-64.
31. Funakoshi H., Frisen J., Barbany G., Timmusk T., Zachrisson O., Verge V. M., Persson H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve // *J Cell Biol.* – 1993. – Т. 123, № 2. – С. 455-65.
32. Kirsch M., Terheggen U., Hofmann H. D. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons // *Mol Cell Neurosci.* – 2003. – Т. 24, № 1. – С. 130-8.
33. Jankowski M. P., McIlwrath S. L., Jing X., Cornuet P. K., Salerno K. M., Koerber H. R., Albers K. M. Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice // *Brain Res.* – 2009. – Т. 1256. – С. 43-54.
34. Bolin L. M., Shooter E. M. Neurons regulate Schwann cell genes by diffusible molecules // *The Journal of Cell Biology.* – 1993. – Т. 123, № 1. – С. 237-243.
35. Kidd G., Andrews S. B., Trapp B. D. Axons regulate the distribution of Schwann cell microtubules // *J Neurosci.* – 1996. – Т. 16, № 3. – С. 946-54.
36. Einheber S., Hannocks M. J., Metz C. N., Rifkin D. B., Salzer J. L. Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions // *The Journal of Cell Biology.* – 1995. – Т. 129, № 2. – С. 443-458.
37. Рубина К. А., Ткачук В. А. НАВИГАЦИОННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В НЕРВНОЙ И СЕРДЕЧНО СОСУДИСТОЙ СИСТЕМАХ // *Biochemistry (Moscow).* – 2015. – Т. 80, № 10. – С. 1503-1521.
38. Wen Z., Zheng J. Q. Directional guidance of nerve growth cones // *Curr Opin Neurobiol.* – 2006. – Т. 16, № 1. – С. 52-8.

39. Letourneau P. C., Shattuck T. A. Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones // *Development*. – 1989. – T. 105, № 3. – C. 505-19.
40. Goldberg J. L. How does an axon grow? // *Genes Dev*. – 2003. – T. 17, № 8. – C. 941-58.
41. Autiero M., De Smet F., Claes F., Carmeliet P. Role of neural guidance signals in blood vessel navigation // *Cardiovascular Research*. – 2005. – T. 65, № 3. – C. 629-638.
42. Lowery L. A., Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2009. – T. 10, № 5. – C. 332-43.
43. Tang B. L. Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms // *Neurochem Int*. – 2003. – T. 42, № 3. – C. 189-203.
44. Bunge M. B., Williams A. K., Wood P. M. Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation // *Dev Biol*. – 1982. – T. 92, № 2. – C. 449-60.
45. Ide C. Peripheral nerve regeneration // *Neurosci Res*. – 1996. – T. 25, № 2. – C. 101-21.
46. Chernousov M. A., Yu W. M., Chen Z. L., Carey D. J., Strickland S. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix // *Glia*. – 2008. – T. 56, № 14. – C. 1498-507.
47. Hoke A., Redett R., Hameed H., Jari R., Zhou C., Li Z. B., Griffin J. W., Brushart T. M. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration // *J Neurosci*. – 2006. – T. 26, № 38. – C. 9646-55.
48. Scheib J., Hoke A. Advances in peripheral nerve regeneration // *Nat Rev Neurol*. – 2013. – T. 9, № 12. – C. 668-76.
49. Huber A. B., Kolodkin A. L., Ginty D. D., Cloutier J. F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance // *Annu Rev Neurosci*. – 2003. – T. 26. – C. 509-63.

50. Perlin J. R., Talbot W. S. Putting the glue in glia: Necls mediate Schwann cell axon adhesion // *J Cell Biol.* – 2007. – T. 178, № 5. – C. 721-3.
51. Baumann N., Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system // *Physiol Rev.* – 2001. – T. 81, № 2. – C. 871-927.
52. Simons M., Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis // *J Cell Sci.* – 2006. – T. 119, № Pt 21. – C. 4381-9.
53. Einheber S., Hannocks M. J., Metz C. N., Rifkin D. B., Salzer J. L. Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions // *J Cell Biol.* – 1995. – T. 129, № 2. – C. 443-58.
54. Toy D., Namgung U. Role of glial cells in axonal regeneration // *Exp Neurobiol.* – 2013. – T. 22, № 2. – C. 68-76.
55. McCaig C. D. Dynamic aspects of amphibian neurite growth and the effects of an applied electric field // *The Journal of Physiology.* – 1986. – T. 375, № 1. – C. 55-69.
56. Castellino F. J., Ploplis V. A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system // *Thromb Haemost.* – 2005. – T. 93, № 4. – C. 647-54.
57. Jaiswal R. K., Varshney A. K., Yadava P. K. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – T. 98. – C. 886-898.
58. Choong P. F., Nadesapillai A. P. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis // *Clin Orthop Relat Res.* – 2003.10.1097/01.blo.0000093845.72468.bd № 415 Suppl. – C. S46-58.

59. Sobel G., Mohler S., Jones N., Dowdy A., Guest M. Urokinase-an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine // *Am J Physiol.* – 1952. – Т. 171, № 3. – С. 768-9.
60. Vassalli J. D. The urokinase receptor // *Fibrinolysis.* – 1994. – Т. 8. – С. 172-181.
61. Ossowski L., Clunie G., Masucci M. T., Blasi F. In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion // *J Cell Biol.* – 1991. – Т. 115, № 4. – С. 1107-12.
62. Плеханова О. С., Парфенова Е. В., Ткачук В. А. Механизмы ремоделирования сосудов после повреждения артерий // *Кардиология.* – 2015. № 7. – С. 63-77.
63. Mahmood N., Mihalcioiu C., Rabbani S. A. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications // *Front Oncol.* – 2018. – Т. 8. – С. 24.
64. Wolf B. B., Vasudevan J., Henkin J., Gonias S. L. Nerve growth factor- γ activates soluble and receptor-bound single chain urokinase-type plasminogen activator // *Journal of Biological Chemistry.* – 1993. – Т. 268, № 22. – С. 16327-16331.
65. Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin // *Journal of Biological Chemistry.* – 1986. – Т. 261, № 8. – С. 3486-3489.
66. Dano K., Andreasen P. A., Grondahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L. S., Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer // *Adv Cancer Res.* – 1985. – Т. 44. – С. 139-266.
67. Appella E., Robinson E. A., Ullrich S. J., Stoppelli M. P., Corti A., Cassani G., Blasi F. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the

growth-factor module of proteases // *J Biol Chem.* – 1987. – T. 262, № 10. – C. 4437-40.

68. Su S. C., Lin C. W., Yang W. E., Fan W. L., Yang S. F. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies // *Expert Opin Ther Targets.* – 2016. – T. 20, № 5. – C. 551-66.

69. Llinas P., Le Du M. H., Gardsvoll H., Dano K., Ploug M., Gilquin B., Stura E. A., Menez A. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide // *EMBO J.* – 2005. – T. 24, № 9. – C. 1655-63.

70. Huai Q., Zhou A., Lin L., Mazar A. P., Parry G. C., Callahan J., Shaw D. E., Furie B., Furie B. C., Huang M. Crystal structures of two human vitronectin, urokinase and urokinase receptor complexes // *Nat Struct Mol Biol.* – 2008. – T. 15, № 4. – C. 422-3.

71. Cunningham O., Andolfo A., Santovito M. L., Iuzzolino L., Blasi F., Sidenius N. Dimerization controls the lipid raft partitioning of uPAR/CD87 and regulates its biological functions // *EMBO J.* – 2003. – T. 22, № 22. – C. 5994-6003.

72. Cubellis M. V., Wun T. C., Blasi F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1 // *EMBO J.* – 1990. – T. 9, № 4. – C. 1079-85.

73. Parfyonova Y. V., Plekhanova O. S., Tkachuk V. A. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis // *Biochemistry (Moscow).* – 2002. – T. 67, № 1. – C. 119-134.

74. Estreicher A., Muhlhauser J., Carpentier J. L., Orci L., Vassalli J. D. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes // *J Cell Biol.* – 1990. – T. 111, № 2. – C. 783-92.

75. Carmeliet P., Moons L., Lijnen R., Baes M., Lemaitre V., Tipping P., Drew A., Eeckhout Y., Shapiro S., Lupu F., Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation // *Nat Genet.* – 1997. – T. 17, № 4. – C. 439-44.
76. Ferraris G. M., Sidenius N. Urokinase plasminogen activator receptor: a functional integrator of extracellular proteolysis, cell adhesion, and signal transduction // *Semin Thromb Hemost.* – 2013. – T. 39, № 4. – C. 347-55.
77. Blasi F., Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling // *FEBS Lett.* – 2010. – T. 584, № 9. – C. 1923-30.
78. Odekon L. E., Sato Y., Rifkin D. B. Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity // *Journal of Cellular Physiology.* – 1992. – T. 150, № 2. – C. 258-263.
79. Resnati M., Pallavicini I., Wang J. M., Oppenheim J., Serhan C. N., Romano M., Blasi F. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/LXA4R // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – T. 99, № 3. – C. 1359-64.
80. Okada S. S., Grobmyer S. R., Barnathan E. S. Contrasting effects of plasminogen activators, urokinase receptor, and LDL receptor-related protein on smooth muscle cell migration and invasion // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1996. – T. 16, № 10. – C. 1269-76.
81. Dumler I., Stepanova V., Jerke U., Mayboroda O. A., Vogel F., Bouvet P., Tkachuk V., Haller H., Gulba D. C. Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin // *Curr Biol.* – 1999. – T. 9, № 24. – C. 1468-76.
82. Tkachuk V. A., Plekhanova O. S., Parfyonova Y. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* – 2009. – T. 87, № 4. – C. 231-251.

83. Stepanova V. V., Tkachuk V. A. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator // *Biochemistry (Mosc)*. – 2002. – Т. 67, № 1. – С. 109-18.
84. Parfenova E. V., Plekhanova O. S., Men'shikov M. I. u., Stepanova V. V., Tkachuk V. A. [Regulation of growth and remodeling of blood vessels: the unique role of urokinase] // *Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова*. – 2009. – Т. 95, № 5. – С. 442-464.
85. Nusrat A. R., Chapman H. A., Jr. An autocrine role for urokinase in phorbol ester-mediated differentiation of myeloid cell lines // *J Clin Invest*. – 1991. – Т. 87, № 3. – С. 1091-7.
86. Degryse B., Resnati M., Rabbani S. A., Villa A., Fazioli F., Blasi F. Src-dependence and pertussis-toxin sensitivity of urokinase receptor-dependent chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells // *Blood*. – 1999. – Т. 94, № 2. – С. 649-62.
87. Smith H. W., Marra P., Marshall C. J. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180 // *J Cell Biol*. – 2008. – Т. 182, № 4. – С. 777-90.
88. Madsen C. D., Ferraris G. M., Andolfo A., Cunningham O., Sidenius N. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key // *J Cell Biol*. – 2007. – Т. 177, № 5. – С. 927-39.
89. Waltz D. A., Chapman H. A. Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy // *J Biol Chem*. – 1994. – Т. 269, № 20. – С. 14746-50.
90. Fazioli F., Resnati M., Sidenius N., Higashimoto Y., Appella E., Blasi F. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity // *EMBO J*. – 1997. – Т. 16, № 24. – С. 7279-86.
91. Montuori N., Bifulco K., Carriero M. V., La Penna C., Visconte V., Alfano D., Pesapane A., Rossi F. W., Salzano S., Rossi G., Ragno P. The cross-talk between

the urokinase receptor and fMLP receptors regulates the activity of the CXCR4 chemokine receptor // *Cell Mol Life Sci.* – 2011. – T. 68, № 14. – C. 2453-67.

92. Degryse B., Sier C. F., Resnati M., Conese M., Blasi F. PAI-1 inhibits urokinase-induced chemotaxis by internalizing the urokinase receptor // *FEBS Lett.* – 2001. – T. 505, № 2. – C. 249-54.

93. Czekay R. P., Aertgeerts K., Curriden S. A., Loskutoff D. J. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins // *J Cell Biol.* – 2003. – T. 160, № 5. – C. 781-91.

94. Nykjaer A., Conese M., Christensen E. I., Olson D., Cremona O., Gliemann J., Blasi F. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes // *EMBO J.* – 1997. – T. 16, № 10. – C. 2610-20.

95. Weaver A. M., Hussaini I. M., Mazar A., Henkin J., Goniás S. L. Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 22. – C. 14372-9.

96. Alexander R. A., Prager G. W., Mihaly-Bison J., Uhrin P., Sunzenauer S., Binder B. R., Schutz G. J., Freissmuth M., Breuss J. M. VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution // *Cardiovasc Res.* – 2012. – T. 94, № 1. – C. 125-35.

97. Zaidel-Bar R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R., Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome // *Nat Cell Biol.* – 2007. – T. 9, № 8. – C. 858-67.

98. Tarui T., Andronicos N., Czekay R. P., Mazar A. P., Bdeir K., Parry G. C., Kuo A., Loskutoff D. J., Cines D. B., Takada Y. Critical role of integrin alpha 5 beta 1 in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 32. – C. 29863-72.

99. Degryse B., Resnati M., Czekay R. P., Loskutoff D. J., Blasi F. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic

- signaling activity: generation of a new integrin inhibitor // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 26. – C. 24792-803.
100. Bohuslav J., Horejsi V., Hansmann C., Stockl J., Weidle U. H., Majdic O., Bartke I., Knapp W., Stockinger H. Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes // *J Exp Med.* – 1995. – T. 181, № 4. – C. 1381-90.
101. Carriero M. V., Del Vecchio S., Capozzoli M., Franco P., Fontana L., Zannetti A., Botti G., D'Aiuto G., Salvatore M., Stoppelli M. P. Urokinase receptor interacts with alpha(v)beta5 vitronectin receptor, promoting urokinase-dependent cell migration in breast cancer // *Cancer Res.* – 1999. – T. 59, № 20. – C. 5307-14.
102. Wei Q., Pohl T. L., Seckinger A., Spatz J. P., Cavalcanti-Adam E. A. Regulation of integrin and growth factor signaling in biomaterials for osteodifferentiation // *Beilstein J Org Chem.* – 2015. – T. 11. – C. 773-83.
103. Aguirre Ghiso J. A., Kovalski K., Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling // *J Cell Biol.* – 1999. – T. 147, № 1. – C. 89-104.
104. Larusch G. A., Merkulova A., Mahdi F., Shariat-Madar Z., Sitrin R. G., Cines D. B., Schmaier A. H. Domain 2 of uPAR regulates single-chain urokinase-mediated angiogenesis through beta1-integrin and VEGFR2 // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2013. – T. 305, № 3. – C. H305-20.
105. Wei Y., Tang C. H., Kim Y., Robillard L., Zhang F., Kugler M. C., Chapman H. A. Urokinase receptors are required for alpha 5 beta 1 integrin-mediated signaling in tumor cells // *J Biol Chem.* – 2007. – T. 282, № 6. – C. 3929-39.
106. Cheah M., Andrews M. R. Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration // *Cells.* – 2018. – T. 7, № 3.
107. Hynes R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // *Cell.* – 2002. – T. 110, № 6. – C. 673-87.

108. Xiong J. P., Stehle T., Diefenbach B., Zhang R., Dunker R., Scott D. L., Joachimiak A., Goodman S. L., Arnaout M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 // *Science*. – 2001. – T. 294, № 5541. – C. 339-45.
109. Plantman S. Proregenerative properties of ECM molecules // *Biomed Res Int*. – 2013. – T. 2013. – C. 981695.
110. Humphries J. D., Byron A., Humphries M. J. Integrin ligands at a glance // *J Cell Sci*. – 2006. – T. 119, № Pt 19. – C. 3901-3.
111. Winograd-Katz S. E., Fassler R., Geiger B., Legate K. R. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2014. – T. 15, № 4. – C. 273-88.
112. Monaghan E., Gueorguiev V., Wilkins-Port C., McKeown-Longo P. J. The receptor for urokinase-type plasminogen activator regulates fibronectin matrix assembly in human skin fibroblasts // *J Biol Chem*. – 2004. – T. 279, № 2. – C. 1400-7.
113. Wei Y., Czekay R. P., Robillard L., Kugler M. C., Zhang F., Kim K. K., Xiong J. P., Humphries M. J., Chapman H. A. Regulation of alpha5beta1 integrin conformation and function by urokinase receptor binding // *J Cell Biol*. – 2005. – T. 168, № 3. – C. 501-11.
114. Tang M. L., Vararattanavech A., Tan S. M. Urokinase-type plasminogen activator receptor induces conformational changes in the integrin alphaMbeta2 headpiece and reorientation of its transmembrane domains // *J Biol Chem*. – 2008. – T. 283, № 37. – C. 25392-403.
115. Aguirre-Ghiso J. A., Liu D., Mignatti A., Kovalski K., Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo // *Mol Biol Cell*. – 2001. – T. 12, № 4. – C. 863-79.

116. Grove L. M., Southern B. D., Jin T. H., White K. E., Paruchuri S., Harel E., Wei Y., Rahaman S. O., Gladson C. L., Ding Q., Craik C. S., Chapman H. A., Olman M. A. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) ligation induces a raft-localized integrin signaling switch that mediates the hypermotile phenotype of fibrotic fibroblasts // *J Biol Chem.* – 2014. – T. 289, № 18. – C. 12791-804.
117. Monaghan-Benson E., McKeown-Longo P. J. Urokinase-type plasminogen activator receptor regulates a novel pathway of fibronectin matrix assembly requiring Src-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor // *J Biol Chem.* – 2006. – T. 281, № 14. – C. 9450-9.
118. Liu D., Aguirre Ghiso J., Estrada Y., Ossowski L. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma // *Cancer Cell.* – 2002. – T. 1, № 5. – C. 445-57.
119. Ghosh S., Johnson J. J., Sen R., Mukhopadhyay S., Liu Y., Zhang F., Wei Y., Chapman H. A., Stack M. S. Functional relevance of urinary-type plasminogen activator receptor-alpha3beta1 integrin association in proteinase regulatory pathways // *J Biol Chem.* – 2006. – T. 281, № 19. – C. 13021-9.
120. May A. E., Neumann F. J., Schomig A., Preissner K. T. VLA-4 (alpha(4)beta(1)) engagement defines a novel activation pathway for beta(2) integrin-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor // *Blood.* – 2000. – T. 96, № 2. – C. 506-13.
121. Degryse B., Fernandez-Recio J., Citro V., Blasi F., Cubellis M. V. In silico docking of urokinase plasminogen activator and integrins // *BMC Bioinformatics.* – 2008. – T. 9 Suppl 2. – C. S8.
122. Pluskota E., Soloviev D. A., Plow E. F. Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration // *Blood.* – 2003. – T. 101, № 4. – C. 1582-90.

123. Семина Е. В., Рубина К. А., Степанова В. В., Ткачук В. А. Участие рецептора урокиназы и его эндогенных лигандов в развитии головного мозга и формировании когнитивных функций // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 8. – С. 881-903.
124. Carmeliet P., Schoonjans L., Kieckens L., Ream B., Degen J., Bronson R., De Vos R., van den Oord J. J., Collen D., Mulligan R. C. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice // Nature. – 1994. – Т. 368, № 6470. – С. 419-24.
125. Karagyaur M., Dyikanov D., Makarevich P., Semina E., Stambolsky D., Plekhanova O., Kalinina N., Tkachuk V. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration // Biomed Pharmacother. – 2015. – Т. 74. – С. 63-70.
126. Karagyaur M., Rostovtseva A., Semina E., Klimovich P., Balabanyan V., Makarevich P., Popov V., Stambolsky D., Tkachuk V. 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. – Т. 372, № 3. – С. 248-255.
127. Карагяур М. Н. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление периферического нерва после травмы // Москва [РФ]: НИИЭК ФГБУ РКНПК МЗ РФ. – 2013.
128. Ikeda M., Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration // Brain Behav. – 2012. – Т. 2, № 4. – С. 382-90.
129. Semina E., Rubina K., Sysoeva V., Rysenkova K., Klimovich P., Plekhanova O., Tkachuk V. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching // Eur J Cell Biol. – 2016. – Т. 95, № 9. – С. 295-310.

130. Рысенкова К. Д., Семина Е. В., Карагяур М. Н., Шмакова А. А., Дыйканов Д. Т., Рубина К. А., Ткачук В. А. Использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии гена урокиназного рецептора в клетках нейробластомы // Технологии живых систем. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 10-19.
131. Wei Y., Eble J. A., Wang Z., Kreidberg J. A., Chapman H. A. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1 // Mol Biol Cell. – 2001. – Т. 12, № 10. – С. 2975-86.
132. Semina E. V., Rubina K. A., Sysoeva V. Y., Stepanova V. V., Tkachuk V. A. Three-dimensional model of biomatrix as a method of studying blood vessels and nerve growth in tissue engineering structures // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2016. – Т. 71, № 3. – С. 172-177.
133. Климович П. С., Семина Е. В. Механизмы участия урокиназного рецептора в направленном росте аксонов // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54, № 1. – С. 1-11.
134. Klimovich P. S., Semina E. V., Karagyaur M. N., Rysenkova K. D., Sysoeva V. Y., 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. – Т. 125, № 1. – С. 1-20.
135. Gardiner N. J. Integrins and the extracellular matrix: key mediators of development and regeneration of the sensory nervous system // Dev Neurobiol. – 2011. – Т. 71, № 11. – С. 1054-72.
136. Vleggeert-Lankamp C. L. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: a systematic review. Laboratory investigation // J Neurosurg. – 2007. – Т. 107, № 6. – С. 1168-89.
137. Карагяур М. Н., Макаревич П. И., Шевченко Е. К., Стамбольский Д. В., Калинина Н. И., Парфёнова Е. В. Современные подходы к регенерации

периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии // *Гены и клетки*. – 2017. – Т. 12, № 1.

138. Jessen K. R., Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves // *Nat Rev Neurosci*. – 2005. – Т. 6, № 9. – С. 671-82.

139. Bologna-Molina R., Mosqueda-Taylor A., Molina-Frechero N., Mori-Estevez A. D., Sanchez-Acuna G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors // *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. – 2013. – Т. 18, № 2. – С. e174-9.

140. Manders e. M. M., Verbeek f. J., Aten j. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images // *Journal of Microscopy*. – 1993. – Т. 169, № 3. – С. 375-382.

141. Lefcort F., Venstrom K., McDonald J. A., Reichardt L. F. Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve // *Development*. – 1992. – Т. 116, № 3. – С. 767-82.

142. Rivellini C., Dina G., Porrello E., Cerri F., Scarlato M., Domi T., Ungaro D., Del Carro U., Bolino A., Quattrini A., Comi G., Previtali S. C. Urokinase plasminogen receptor and the fibrinolytic complex play a role in nerve repair after nerve crush in mice, and in human neuropathies // *PLoS One*. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. e32059.

143. Huang E., Reichardt L. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Ann Rev Neurosci* 24: 677-736 // *Annual review of neuroscience*. – 2001. – Т. 24. – С. 677-736.

144. Martinez-Marcos A., Trejo J. L., Lopez-Mascaraque L. Editorial: 50th Anniversary of Adult Neurogenesis: Olfaction, Hippocampus, and Beyond // *Front Neurosci*. – 2016. – Т. 10. – С. 319.

145. Klimovich P., Rubina K., Sysoeva V., Semina E. Three-Dimensional Model of Dorsal Root Ganglion Explant as a Method of Studying Neurotrophic Factors in Regenerative Medicine // BIOMEDICINES. – 2020. – T. 8, № 49.
146. Archinti M., Britto M., Eden G., Furlan F., Murphy R., Degryse B. The urokinase receptor in the central nervous system // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2011. – T. 10, № 2. – C. 271-94.
147. Bruneau N., Szepetowski P. The role of the urokinase receptor in epilepsy, in disorders of language, cognition, communication and behavior, and in the central nervous system // Curr Pharm Des. – 2011. – T. 17, № 19. – C. 1914-23.
148. Sumi Y., Dent M. A., Owen D. E., Seeley P. J., Morris R. J. The expression of tissue and urokinase-type plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth // Development. – 1992. – T. 116, № 3. – C. 625-37.
149. Lino N., Fiore L., Rapacioli M., Teruel L., Flores V., Scicolone G., Sanchez V. uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuritogenesis // Dev Dyn. – 2014. – T. 243, № 5. – C. 676-89.
150. Hayden S. M., Seeds N. W. Modulated expression of plasminogen activator system components in cultured cells from dissociated mouse dorsal root ganglia // J Neurosci. – 1996. – T. 16, № 7. – C. 2307-17.
151. Merino P., Diaz A., Jeanneret V., Wu F., Torre E., Cheng L., Yepes M. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Binding to the uPA Receptor (uPAR) Promotes Axonal Regeneration in the Central Nervous System // J Biol Chem. – 2017. – T. 292, № 7. – C. 2741-2753.
152. Wu F., Catano M., Echeverry R., Torre E., Haile W. B., An J., Chen C., Cheng L., Nicholson A., Tong F. C., Park J., Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator promotes dendritic spine recovery and improves neurological outcome following ischemic stroke // J Neurosci. – 2014. – T. 34, № 43. – C. 14219-32.

153. Nakajima K., Reddington M., Kohsaka S., Kreutzberg G. W. Induction of urokinase-type plasminogen activator in rat facial nucleus by axotomy of the facial nerve // *J Neurochem.* – 1996. – T. 66, № 6. – C. 2500-5.
154. Chen P., Gong S., Song P., Huang X. [Effect of urokinase plasminogen activator on injured facial nerve of rats] // *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* – 2004. – T. 18, № 10. – C. 623-6.
155. Sørensen J., Fugleholm K., Moldovan M., Schmalbruch H., Krarup C. Axonal elongation through long acellular nerve segments depends on recruitment of phagocytic cells from the near-nerve environment. Electrophysiological and morphological studies in the cat // *Brain research.* – 2001. – T. 903, № 1-2. – C. 185-197.
156. Hillig T., Engelholm L. H., Ingvarsen S., Madsen D. H., Gardsvoll H., Larsen J. K., Ploug M., Dano K., Kjoller L., Behrendt N. A composite role of vitronectin and urokinase in the modulation of cell morphology upon expression of the urokinase receptor // *J Biol Chem.* – 2008. – T. 283, № 22. – C. 15217-23.
157. Pinkstaff J. K., Detterich J., Lynch G., Gall C. Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain // *J Neurosci.* – 1999. – T. 19, № 5. – C. 1541-56.
158. Wallquist W., Zelano J., Plantman S., Kaufman S. J., Cullheim S., Hammarberg H. Dorsal root ganglion neurons up-regulate the expression of laminin-associated integrins after peripheral but not central axotomy // *J Comp Neurol.* – 2004. – T. 480, № 2. – C. 162-9.
159. Vogelezang M. G., Liu Z., Relvas J. B., Raivich G., Scherer S. S., ffrench-Constant C. Alpha4 integrin is expressed during peripheral nerve regeneration and enhances neurite outgrowth // *J Neurosci.* – 2001. – T. 21, № 17. – C. 6732-44.
160. Bouvard D., Pouwels J., De Franceschi N., Ivaska J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2013. – T. 14, № 7. – C. 430-42.

161. Yanagida H., Tanaka J., Maruo S. Immunocytochemical localization of a cell adhesion molecule, integrin alpha5beta1, in nerve growth cones // *J Orthop Sci.* – 1999. – T. 4, № 5. – C. 353-60.
162. Gonzalez-Perez F., Ale A., Santos D., Barwig C., Freier T., Navarro X., Udina E. Substratum preferences of motor and sensory neurons in postnatal and adult rats // *Eur J Neurosci.* – 2016. – T. 43, № 3. – C. 431-42.
163. Gardiner N. J., Moffatt S., Fernyhough P., Humphries M. J., Streuli C. H., Tomlinson D. R. Preconditioning injury-induced neurite outgrowth of adult rat sensory neurons on fibronectin is mediated by mobilisation of axonal alpha5 integrin // *Mol Cell Neurosci.* – 2007. – T. 35, № 2. – C. 249-60.
164. Condic M. L. Adult neuronal regeneration induced by transgenic integrin expression // *J Neurosci.* – 2001. – T. 21, № 13. – C. 4782-8.
165. Ciccarone V., Spengler B. A., Meyers M. B., Biedler J. L., Ross R. A. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages // *Cancer Res.* – 1989. – T. 49, № 1. – C. 219-25.
166. Tarui T., Akakura N., Majumdar M., Andronicos N., Takagi J., Mazar A. P., Bdeir K., Kuo A., Yarovoi S. V., Cines D. B., Takada Y. Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin alpha v beta 3 induces signal transduction and enhances plasminogen activation // *Thromb Haemost.* – 2006. – T. 95, № 3. – C. 524-34.
167. de Paulis A., Montuori N., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F. W., Visconte V., Rossi G., Marone G., Ragno P. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous ligand for formyl peptide receptor-like 1 and -like 2 // *J Immunol.* – 2004. – T. 173, № 9. – C. 5739-48.
168. Pliyev B. K. Activated human neutrophils rapidly release the chemotactically active D2D3 form of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR/CD87) // *Mol Cell Biochem.* – 2009. – T. 321, № 1-2. – C. 111-22.