На правах рукописи

РЫСЕНКОВА КАРИНА ДМИТРИЕВНА

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ

03.01.04 – биохимия

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научные руководители:

доктор биологических наук, доцент	Рубина Ксения Андреевна
кандидат биологических наук	Семина Екатерина Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,	Гривенников Игорь Анатольевич
	i pubeninkob in opb i mutombebn i

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», лаборатория молекулярной генетики соматических клеток, заведующий лаборатории

доктор биологических наук,

Яшин Денис Владимирович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии гена Российской академии наук», лаборатория молекулярной иммуногенетики рака, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Защита диссертации состоится « »_____ 20___ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.14 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте <u>http://www.rsmu.ru/</u>

Автореферат разослан « »_____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Выяснение механизмов иннервации во взрослом организме и при морфогенезе органов и тканей является важной задачей регенеративной медицины. Поскольку для облегчения роста нервов и миграции клеток необходим протеолиз белков внеклеточного матрикса, то вероятно, повышение содержания компонентов урокиназной системы, возникающее при травме нерва в зоне повреждения необходимо для его регенерации (Siconolfi et al., 2001). При этом система активатора плазминогена урокиназного типа, которая состоит из сериновой протеазы урокиназы (uPA) и ее рецептора (uPAR), не только запускает каскад протеолиза белков внеклеточного матрикса, но и обладает рядом сигнальных эффектов, стимулируя миграцию, пролиферацию и дифференцировку разных типов клеток (Plekhanova et al., 2009; Tkachuk et al., 2006). Введение плазмиды, содержащей ген иРА, ускоряет восстановление морфологии нерва и его проводимости (Karagyaur et al., 2015). Данный эффект описан для классических нейротрофинов и позволяет предположить нейротрофическую функцию uPA за счет регуляции внутриклеточных процессов в нейронах (Рубина и др., 2018). Было установлено, что рост нейритов в клетках нейробластомы in vitro в условиях депривации от сыворотки в среде культивирования приводит к секреции активаторов плазминогена на конусе роста нейритов (Krystosek, Seeds, 1981). При этом миграция нейронов и рост нейритов/нейритогенез имеют дозовую зависимость от uPA: чем больше концентрация урокиназы в среде культивирования, тем выше ее эффект на клетки (Lino et al., 2014).

Сигнальная функция uPA в клетках реализуется при взаимодействии uPA со своим рецептором uPAR. По структуре uPAR является гликозилфосфатидилинозитол-(GPI-) заякоренным белком и обладает высокой латеральной подвижностью, вступая во взаимодействие с различными трансмембранными рецепторами – α5 и β1 субъединицами интегринов, рецепторными тирозиновыми киназами, такими как EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) и регулирует внутриклеточную сигнализацию, стимулирующую миграцию и адгезию нейронов к матриксу. На модели повреждения аксонов ЦНС было показано, что uPAR индуцирует активацию β1 интегрина за счет взаимодействия с рецептором LRP1, что приводит к активации малой ГТФазы Rac1, которая стимулирует регенерацию аксонов (Merino et al., 2017).

Таким образом, описан ряд эффектов урокиназной системы в регенерации нервов, однако, к настоящему времени неизвестны молекулярные механизмы участия урокиназы и ее рецептора в пролиферации и выживаемости нейронов, а также в их дифференцировке и нейритогенезе, а именно регулирует ли uPA/uPAR направленный рост аксонов и их ветвление.

3

Цель работы:

Определение молекулярного механизма, опосредующего участие рецептора урокиназы (uPAR) в процессах дифференцировки и выживаемости линейных клеток нейробластомы мыши Neuro2a с участием рецепторных тирозиновых киназ EGFR и Trk.

Задачи:

1. Создать клетки нейробластомы мыши Neuro2a с различным уровнем экспрессии uPAR с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9n и методов плазмидной трансфекции (кДНК uPAR, PHK-интерференция);

2. Определить влияние экспрессии и активности uPAR на выживаемость и дифференцировку клеток нейробластомы мыши Neuro2a;

3. Оценить влияние экспрессии и активности uPAR на активацию рецепторных тирозиновых киназ EGFR и TrkC и регуляцию внутриклеточной сигнализации с участием этих рецепторов.

Научная новизна

Впервые показано, что в результате блокирования uPAR нарушается рост и ветвление нейритов в клетках Neuro2a, что сопровождается снижением уровня дифференцировки Neuro2a и гибелью клеток.

Впервые описан сигнальный механизм участия uPAR в регуляции пролиферации, нейритогенеза (дифференцировки) и выживаемости клеток Neuro2a с участием рецепторных тирозиновых киназ EGFR и TrkC и их сигнальных посредников протеинкиназ Akt и ERK1/2, и p38.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в работе результаты могут быть использованы при разработке терапевтических подходов для восстановления иннервации при травмах различного генеза и нейродегенеративных заболеваниях, а также терапевтических препаратов комплексного воздействия на uPAR и рецепторные тирозиновые киназы Trk и EGFR, опосредующие выживаемость, дифференцировку и пролиферацию нейробластомы.

Положения, выносимые на защиту

1. uPAR регулирует направление роста аксонов и их ветвление: блокирование uPAR усиливает ветвление аксонов и нарушает траекторию их роста.

2. uPAR поддерживает выживаемость и дифференцировку линейных клеток Neuro2a. Нокаут *uPAR* ингибирует рост нейритов, подавляет пролиферацию и активирует каспазазависимый апоптоз клеток Neuro2a. Блокирование активности uPAR приводит к потере экспрессии нейронального маркера NeuN, индуцирует апоптоз и деградацию ДНК.

3. Гиперэкспрессия uPAR приводит к увеличению уровня pEGFR и pERK1/2 и стимулирует рост нейритов. Апоптоз Neuro2a, запускаемый блокированием uPAR, реализуется путем снижения уровня pEGFR, его нисходящего посредника pERK1/2 и

активации проапоптотической внутриклеточной сигнализации с участием киназ pAkt (по участку S473) и p38.

4. Нокаут *uPAR* снижает экспрессию полноразмерной формы TrkC и активность его нисходящих сигнальных посредников киназ Akt (по участку T308) и p38.

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовала в постановке и реализации задач диссертационной работы. Результаты, изложенные в диссертации, получены автором лично. Диссертант является первым автором трех публикаций, подготовленных по теме диссертации.

Методология и методы исследования

В работе использовали современные молекулярно-биологические и биохимические методы, а также подходы, применяемые в клеточной биологии, в т. ч. культуры линейных клеток. Одним из модельных объектов исследования являлась линейная культура нейробластомы мыши (Neuro2a). Функции uPAR в клетках Neuro2a изучали с использованием двух методических подходов: блокировали активность белка uPAR на поверхности клеток и изменяли экспрессию гена *uPAR*.

Степень достоверности

Приведенные в работе научные положения и выводы по полученным результатам основаны на достоверных данных. Статистическая обработка проводилась при помощи пакета прикладной программы Statistica (Statsoft, Inc. 1984-2011).

Апробация, внедрение, публикации

Материалы диссертации были представлены на Международном конгрессе CRISPR-2018 (Россия, Новосибирск, 2018); III и IV Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицине (Россия, Москва, 2017; 2019); VI Съезде физиологов с международным участием (Россия, Сочи, 2019).

Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность на факультете фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ имени М.В. Ломоносова и в научно-исследовательскую деятельность лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России.

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 10 статей в научных рецензируемых изданиях, из них: 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, 7 статей в журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и 8 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

Апробация была проведена на заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 183 страницах, состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключения и списка литературы. Список литературы включает 354 публикаций отечественных и иностранных авторов. Диссертационная работа иллюстрирована 3 таблицами и 37 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Линейная культура нейробластомы мыши Neuro2a характеризуется нестабильным кариотипом и используется в качестве модели для изучения нейрональной дифференцировки. Для запуска нейритогенеза в Neuro2a проводили депривацию клеток от сыворотки (1% FBS) в среде культивирования.

Нокаут гена *uPAR* в клетках Neuro2a. Проводили молекулярное клонирование *uPAR*специфических направляющих PHK в вектор pX458nickase (CRISPR/Cas9n), содержащий ген *Cas9 S. pyogenes* и ген *EGFP* (рис.5A). Для нокаута *uPAR* проводили три последовательные ко-трансфекции с использованием эквимолярной смеси полученных плазмид pX458nickase-sg1 и pX458nickase-sg2, а затем клетки сортировали по уровню EGFP. Содержание uPAR на поверхности клеточной мембраны в s1, s2 и s3 клеточных популяциях оценивали с помощью проточной цитометрии. Содержание uPAR на уровне отдельных клонов оценивали методом иммуноблоттинга и ПЦР в реальном времени. Подтверждение нокаута *uPAR*, отсутствие нецелевых сайтов модификации, а также проверку последовательности полученных плазмид проводили путем секвенирования (Evrogen).

Создание плазмиды phCMV1-uPAR для гиперэкспрессии. кДНК uPAR получали на основе тотальной PHK, выделенной из Neuro2a с помощью обратной транскрипции и ПЦР со специфическими праймерами. кДНК uPAR встраивали в вектор phCMV1. Проверку последовательности вставки проводили путем секвенирования (Evrogen).

Получение и анализ клеточных линий Neuro2a с различным уровнем содержания иPAR. Для подавления экспрессии uPAR клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей короткие шпилечные олигонуклетиды, специфичные к мPHK uPAR (shuPAR). Для гиперэкспрессии uPAR клетки трансфицировали плазмидой phCMV1-uPAR. Для селекции Neuro2a, стабильно экспрессирующих uPAR, клетки культивировали в присутствии антибиотика G418 в концентрации 400 мкг/мл. Уровень мPHK uPAR оценивали методом ПЦР в реальном времени; содержание белка uPAR оценивали методом иммуноблоттинга.

Анализ пролиферации клеток Neuro2a in vitro. Число живых клеток определяли с использованием автоматической системы Countess® Automated Cell Counter (Thermo Scientific). Данные представлены в виде кривых зависимости числа живых клеток от времени. Клеточный индекс оценивали при введении EGF (50 нг/мл), BSA (50 нг/мл), AG1478 (20 мкМ), и DMSO (0,2%) с помощью системы для прижизненной регистрации IncuCyte® ZOOM Live Cell Analysis System (Essen Bioscience). Клетки фотографировали каждый час в 9 случайно выбранных полях зрения на лунку в течение 137 ч. Здесь и далее при длительных съемках клетки инкубировали при 37°С и 5% CO₂. Процент ki-67+

контрольных Neuro2a клеток (wt) и клонов с нокаутом *uPAR* (#6, #30) анализировали с помощью проточной цитометрии FACS BD FACSCantoTMII.

Анализ нейритогенеза проводили в контрольных клетках Neuro2a (wt), при блокировании uPAR антителами и в клетках с разным уровнем экспрессии uPAR (#6 клон с нокаутом *uPAR*, uPAR↑ клетки с гиперэкспрессией), при введении ингибитора EGFR (AG1478, 20 мкМ) и его лиганда (EGF, 50 нг/мл). Микрофотографии получали с помощью микроскопа Leica AF6000 LX или системы IncuCyte®. Длину нейритов и количество точек ветвления оценивали в программе *ImageJ* (плагин NeuronJ) или автоматически с использованием алгоритма IncuCyte® NeuroTrack Software Module (#9600-0010), который вычисляет среднюю длину нейритов на единицу площади (мм²). Полученное значение нормировали на площадь, занимаемую телами клеток.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток Neuro2a проводили первичными антителами крысы против uPAR (MAB531), первичными антителами кролика против pEGFR (ab40815), вторичными антителами, конъюгированными с фруорохромом AlexaFluor594 или AlexaFluor488 (Thermo Scientific), ядра окрашивали DAPI (Life Technologies). Микрофотографии получали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Germany). Интенсивность флуоресценции pEGFR оценивали в программе *ImageJ*.

Иммуноблоттинг. Блокирование uPAR в Neuro2a проводили моноклональными антителами крысы в концентрации 25 мкг/мл (MAB531) в течение различных интервалов времени (5, 30, 120 мин и 5, 24 ч). Ингибировали EGFR с помощью AG1478 (100 мкМ) в течение 1 ч; лиганд EGFR EGF (50 нг/мл) инкубировали 5 мин. Лизаты клеток получали с использованием буфера Леммли для образцов (#1610747), содержащего β -меркаптоэтанол в концентрации 4%. Для разделения белков на фракции использовали набор Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen, #37502). Электрофорез белков проводили методом Леммли; белки переносили на мембрану PVDF. В работе использовали антитела к следующим белкам: Akt (#2966S), p-Akt (S347) (#587F11) и p-Akt (T308) (#9275), ERK1+ERK2 (ab17942), p-ERK1 (pT202/pY204)+p-ERK2(pT185/pY187) (ab4819), p-EGFR (Y1068) (ab40815), p38 (ab31828) и p-p38 (ab32557), RIT (sc367273), MAP2 (ab32454), каспазе 3 (ab32351) и PARP-1 (sc7150), β 3-тубулину (sc-51670), β -актину (#3779), GAPDH (sc25778) и винкулину (V9131).

Анализ степени деградации ДНК методом ДНК комет. uPAR блокировали антителами (25 мкг/мл), либо вносили IgG в качестве контроля. Повреждение ДНК анализировали через 72 и 120 ч методом электрофореза ядер клеток в агарозном геле в щелочном буфере (Cell Biolabs OxiSelectTM). Образцы фотографировали на микроскопе Leica AP6000LX с использованием фильтра FITC. Количественный анализ деградации ДНК проводили в программе ImageJ (плагин OpenComet) и определяли показатель хвостового момента, который включает процент ДНК в хвосте кометы, умноженный на длину хвоста кометы. Процент ДНК в хвосте кометы равен отношению значения флуоресценции хвоста кометы к общей флуоресценции кометы и умножен на

7

100.Статистическая обработка результатов. Все эксперименты повторяли как минимум три раза.

Статистический анализ проводили в программе Statistica (Statsoft, Inc. 1984-2011). Для парных сравнений в случае нормального распределения значений, применяли tкритерий Стьюдента; в других случаях использовали тест Манна-Уитни. Для множественных сравнений данные проанализировали с использованием ANOVA (тест Newman-Keuls). Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка влияния активности uPAR на выживаемость и дифференцировку клеток Neuro2a

1.1. Активность uPAR важна для дифференцировки Neuro2a клеток

Для изучения функции uPAR в процессе нейритогенеза Neuro2a, проводили блокирование uPAR антителами, которые препятствуют связыванию uPA с урокиназным рецептором. Оказалось, что в результате 24 ч блокирования uPAR усиливается ветвление нейритов и возрастает число нейритов на клетку (рис.2А, Б). Также повышается уровень экспрессии малого G-белка RIT, ответственного за ветвление нейритов (Rudolph et al., 2007), и появляются высокомолекулярные изоформы белка MAP2, ответственного за стабилизацию микротрубочек (Leclerc et al., 1993) (рис.1В). Эта сигнализация отражает перестройку цитоскелета, вызванную блокированием uPAR. Исходя из этого, можно предположить, что uPAR регулирует траекторию роста нейритов – процессы, отражающие дифференцировку и выживаемость нейронов.

Известно, что GPI-заякоренный белок uPAR может реализовывать свои эффекты через регуляцию внутриклеточной сигнализации с участием мембранных белков партнеров – интегринов, EGFR, LRP и FPRL1. Среди данных мембранных белков важную функцию в пролиферации и выживаемости нейронов выполняет EGFR. С использованием мышей, нокаутных по гену *EGFR*, было показано, что EGFR необходим для выживаемости нейронов коры головного мозга (Sibilia et al., 1998). Обнаружив, что активность uPAR важна для направленного роста нейритов, мы оценили уровень активации EGFR при блокировании uPAR. Оказалось, что уровень pEGFR существенно снижался уже к 5 мин блокирования uPAR, одновременно с этим происходило падение уровня активации MAPкиназы ERK1/2 (рис.2). Наблюдаемые изменения могут оказывать решающее значение, как для дифференцировки, так и для выживаемости Neuro2a. И действительно мы установили падение уровня содержания маркера NeuN при длительном блокировании uPAR (рис.2), что может свидетельствовать о гибели нейронов.



Рисунок 1. Блокирование uPAR антителами вызывает увеличение ветвления нейритов и стимулирует нейритогенез. А – микрофотографии контрольных клеток Neuro2a при добавлении неиммунных IgG (контроль) и при блокировании uPAR антителами в течении 24 ч. Стрелки указывают на нейриты (контроль) и точки ветвления нейритов при блокировании uPAR. Б – количественная оценка числа нейритов, степени ветвления и средней длины нейритов, анти-uPAR – блокирование uPAR. Данные представлены как среднее значение +/-SD (N=100), *p<0,05. В – анализ уровня MAP2 и RIT1 в лизатах Neuro2a методом иммуноблоттинга. В качестве контроля загрузки использовали β 3-тубулин.



Рисунок 2. Блокирование uPAR в Neuro2a клетках изменяет внутриклеточную сигнализацию, опосредующую дифференцировку и гибель клеток. Депривированные Neuro2a клетки инкубировали с антителами, блокирующими uPAR (25 мкг/мл) в течение указанного времени; клеточные лизаты анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител к pEGFR, pERK1/2, ERK1/2, pERK1/2 и NeuN. В качестве контроля загрузки использовали β3-тубулин.

1.2. Стимуляция роста нейритов в Neuro2a повышает мРНК иPAR, но не EGFR

Для стимуляции нейритогенеза клетки Neuro2a культивировали в среде с пониженным содержанием сыворотки (1% FBS). Оказалось, что длительная депривация (72 ч), сопровождаемая значительным ростом нейритов (рис.ЗА), увеличивает содержание мРНК uPAR (рис.3Б), что может отражать участие uPAR как в процессах нейритогенеза, так и в поддержании выживаемости клеток при длительном культивировании в среде со сниженным содержанием факторов роста. Известно, что высокая активность EGFR необходима не только для пролиферации клеток (Hu et al., 2016; Ayuso-Sacido et al., 2009), но и крайне важна для выживаемости нейронов (Sibilia et al., 1998). Поэтому далее мы оценивали уровень экспрессии мРНК EGFR (рис.3В) и активацию EGFR (рис.4Г) при депривации клеток. Оказалось, что уровень экспрессии ядерного маркера зрелых нейронов NeuN несмотря на снижение базального не изменялся, уровня фосфорилирования EGFR при длительной депривации (24 и 48 ч). Эти данные свидетельствует о том, что клетки сохраняли жизнеспособность, несмотря на снижение активности EGFR в результате уменьшения содержания факторов роста R бессывороточной среде культивирования.



Рисунок 3. Депривация Neuro2a клеток стимулирует экспрессию мРНК uPAR, но не EGFR. А – длительная депривация Neuro2a (1% FBS) стимулирует рост нейритов. Масштабный отрезок 75 мкм. Б – РТ-ПЦР анализ уровня экспрессии мРНК uPAR через 0, 24, 48, 72 ч депривации; В – РТ-ПЦР анализ уровня мРНК EGFR через 0, 24, 48, 72 ч депривации. Значения представлены как среднее +/- SD (N=3), *p<0,05 (по ANOVA, тест Дункана). Г – анализ уровня экспрессии белка EGFR, pEGFR и NeuN в лизатах Neuro2a методом иммуноблоттинга. В качестве контроля белковой загрузки использовали β 3-тубулин.

Таким образом, активность uPAR важна для направленного роста нейритов и их ветвления (рис.1). Ветвление нейритов в клетках Neuro2a, вызванное блокированием uPAR, снижает уровень экспрессии маркера нейронов NeuN. Полученные данные (рис.2) свидетельствуют также о том, что активность EGFR и его нисходящего посредника ERK1/2 зависит от активности uPAR, так как блокирование uPAR снижает их

фосфорилирование. Стимуляция роста нейритов в клетках Neuro2a повышает экспрессию uPAR, который, вероятно, поддерживает их дифференцировку, поскольку уровень NeuN при этом не изменяется (рис.3).

1.3. Активность иPAR регулирует выживаемость Neuro2a клеток

Снижение экспрессии NeuN в клетках Neuro2a при блокировании uPAR антителами в течение 24 ч может свидетельствовать как о нарушении нейрональной дифференцировки, так и отражать их гибель (Gusel'nikova et al., 2015). Поэтому далее мы оценивали число живых клеток в культуре при длительном блокировании uPAR (до 120 ч) и апоптоз. Через 72 ч блокирования uPAR количество клеток заметно снижается, а через 120 ч наблюдается наибольшее снижение (в 3,7 раза) по сравнению с контролем (рис.4А), что может свидетельствовать о гибели клеток.



Рисунок 4. Блокирование иРАR приводит к апоптотической гибели клеток Neuro2a. А – снижение общего числа клеток при блокировании иРАR. Б – микрофотография агарозного геля с ядрами клеток Neuro2a, окрашенными с использованием FITC-меченного реагента. Электрофорез в щелочных условиях (метод ДНК-комет) с использованием лизатов клеток Neuro2a после блокирования иРАR. IgG – неиммунные антитела крысы. В – количественный анализ деградации ДНК, проведенный с использованием ImageJ (плагин OpenComet), *p <0,05. Г – оценка степени деградации ДНК. Д – анализ уровня p-Akt, p-p38, p-c-Src и PARP-1 при блокировании иPAR методом иммуноблоттинга. В качестве контроля загрузки использовали b-актин.

Клеточную гибель Neuro2a оценивали по степени деградации ДНК методом ДНКкомет. Было установлено значительное (более 3 раз) увеличение длины хвоста комет в клетках при блокировании uPAR, что отражает накопление большего числа разрывов в ДНК (рис.4Б, В). При анализе степени разрушения ДНК, стало ясно, что средняя и высокая степень деградации ДНК наблюдается только при блокировании uPAR (рис.4Г), в то время как в контроле деградация ДНК выражена слабо, либо отсутствует вовсе. Известно, что деградация ДНК ассоциирована с каспаза-зависимой гибелью клеток. Мы показали, что через 24 ч блокирования uPAR происходит ограниченный протеолиз фермента PARP-1 с образованием фрагмента 89 кДа, который свидетельствует о разрушении ДНК вследствие активации апоптоза (Bouchard et al., 2003).

Поскольку блокирование uPAR с помощью антител может носить временный характер (см. восстановление pEGFR и pERK1/2 при блокировании антителами к uPAR через 24 часа (рис.2)), зависящий от скорости деградации антител, далее мы оценивали эффекты uPAR в дифференцировке и выживаемости с использованием клеток Neuro2a с подавленной экспрессией uPAR, нокаутом *uPAR* и с гиперэкспрессией uPAR.

2. Оценка влияния экспрессии uPAR на выживаемость и дифференцировку клеток Neuro2a

2.1. Использование технологии CRISPR/Cas9n для нокаута гена иPAR в Neuro2a клетках

Для нокаута *uPAR* в Neuro2a проводили три последовательные трансфекции клеток плазмидами pX458nickase-sg1 и pX458nickase-sg2 (рис.5А).



Рисунок 5. Получение клонов с нокаутом *uPAR* с помощью CRISPR/Cas9n. A – проведение трех последовательных плазмидных трансфекций Neuro2a; Б - сортировка EGFP-положительных популяций s1, s2, s3 после каждой трансфекции; В - анализ содержания uPAR методом проточной цитофлуориметрии; Г – анализ содержания белка в отобранных клонах Neuro2a методом иммуноблоттинга. Wt – контрольные клетки Neuro2a; #1, #3, #6, #8, #12, #15, #30 - клоны Neuro2a после трансфекции и экспансии единичной клетки. В качестве контроля белковой загрузки использовали β3-тубулин.

Для отбора клеток, в которые произошла доставка плазмид, проводили сортировку EGFP+ популяций после каждой трансфекции (рис.5Б). Далее оценивали уровень содержания uPAR на поверхности Neuro2a методом проточной цитофлуориметрии в

каждой отобранной популяции клеток (s1, s2, s3). Так как после третьей трансфекции произошло снижение uPAR-экспрессирующих клеток в два раза (рис.5В), то для клонирования и отбора клонов с нокаутом *uPAR* использовали s3 популяцию. Клетки высаживали на 48-луночные планшеты в количестве 1 клетки на лунку. Результаты анализа содержания белка uPAR в клонах представлены на рисунке 5Г.

Для выполнения последующих экспериментальных задач по выяснению функциональной значимости нокаута *uPAR* были использованы клоны #3, #6 и #30. Проведенное секвенирование показало наличие полного нокаута гена *uPAR* в клоне #6, тогда как клон #3 имел делецию 62 нуклеотида в 66% аллелей, а клон #30 характеризовался 75% дефектных аллелей (две аллели несли вставку из 4 нуклеотидов; один аллель делецию 6 нуклеотидов, потенциально восстанавливающий рамку считывания; и один аллель с делецией 19 нуклеотидов) (рис. 6).



Рисунок 6. Результат секвенирования по Сенгеру, с праймерами, специфичными к гену *uPAR*. Анализ последовательностей проводили с использованием программ ChromasLite и TIDE (https://tide.deskgen.com/). Приведена последовательность ДНК из #6 клона, несущего гомозиготный сдвиг рамки (делеция 62 нуклеотидов), приводящий к полному нокауту *uPAR*. Разрыв между последовательностями выделен оранжевым и фиолетовым цветами в wt и отражает 62-нуклеотидную делецию в клоне #6. РАМ - последовательность ССG, следующая сразу за последовательностью ДНК, к которой специфична гидовая PHK (sg1 или sg2) и Cas9n.

2.2. Гиперэкспрессия иPAR в Neuro2a клетках увеличивает уровень pEGFR и активирует EGFR-зависимую внутриклеточную сигнализацию, регулирующую их дифференцировку и выживаемость

В силу того, что индукция дифференцировки вызывает повышение экспрессии uPAR в Neuro2a (рис.3Б), которая важна для поддержания дифференцированного состояния, а блокирование uPAR снижает фосфорилирование EGFR (рис.2) И активирует проапоптотическую внутриклеточную сигнализацию (рис.2, рис.4Д), далее мы оценили уровень фосфорилирования EGFR в клетках с различным уровнем экспрессии uPAR. По иммунофлуоресцентного окрашивания И последующей конфокальной данным гиперэкспрессии uPAR микроскопии ΜЫ установили, что при возрастает фосфорилирование EGFR на мембране клеток (рис.7А, В). При этом уровень экспрессии EGFR в этих клетках остается неизменным (рис.7Б).



Рисунок 7. Гиперэкспрессия uPAR увеличивает фосфорилирование EGFR.

А – иммунофлуоресцентное окрашивание uPAR (красная флуоресценция) и pEGFR (зеленая флуоресценция) в контрольных клетках Neuro2a (контроль), Neuro2a с гиперэкспрессией uPAR (uPAR[†]) или Neuro2a при подавлении uPAR (sh-uPAR). Ядра окрашены DAPI. Стрелкой показана клетка с повышенной экспрессией uPAR, в которой увеличено фосфорилирование EGFR. Масштабный отрезок 20 мкм. Б - Интенсивность флуоресценции pEGFR оценивали в программе *ImageJ*. В – оценка уровня мPHK EGFR в Neuro2a с различным уровнем uPAR. Г – анализ уровня pEGFR и EGFR методом иммуноблоттинга; wt контроль, гиперэкспрессия uPAR (uPAR[†]) и подавление содержания uPAR (sh-uPAR), клеток с нокаутом *uPAR* (#6). В качестве контроля загрузки использовали β 3-тубулин. Д – денситометрический анализ полученных результатов проводили в программе *ImageJ*.

Для того чтобы определить, обуславливает ли экспрессия uPAR изменения EGFRзависимой внутриклеточной сигнализации, мы провели ингибиторный анализ с использованием селективного ингибитора EGFR AG1478, и его лиганда EGF в клетках Neuro2a с различным уровнем экспрессии uPAR. При этом мы оценили уровень фосфорилирования ERK1/2 как одного из основных нисходящих посредников EGFR- зависимого сигнального пути в цитоплазматической фракции лизатов Neuro2a. Было установлено, что базальный уровень фосфорилирования ERK1/2 (pERK1/2, DMSO как AG1478) наблюдается контрольных И uPARрастворитель только в (wt) гиперэкспрессирующих клетках (uPAR↑), причем в uPAR↑ клетках содержание pERK1/2 было в 1,8 раза больше, чем в wt клетках (рис. 7А, В). В клетках с нокаутом *uPAR* (клон #6) содержание pERK1/2 было снижено по сравнению с wt и uPAR↑ клетками (рис.7А, В). Снижение цитоплазматического уровня pERK1/2 в Neuro2a может отражать снижение степени дифференцировки (Zou et al., 2018) (рис.7Б, Г). Введение ингибитора EGFR AG1478 снижало уровень pERK1/2 в wt и uPAR↑ клетках в 7 и 9,5 раз, соответственно (рис.7А, В). Однако в клетках с нокаутом uPAR (клон #6) ингибитор EGFR не оказывал влияния на уровень pERK1/2.



Рисунок 8. Влияние экспрессии uPAR на уровень pERK1/2 в цитоплазматической и ядерной фракциях Neuro2a клеток. Анализ уровня экспрессии ERK1/2, pERK1/2 и GAPDH проводили методом иммуноблоттинга с использованием лизатов контрольных Neuro2a (wt), гиперэкспрессирующих uPAR (uPAR↑) и клеток с нокаутом *uPAR* (#6). А - после инкубации (1 ч) с AG1478. ингибитором EGFR (100 мкМ), и DMSO в качестве контроля (1%). Б - после инкубации (5 мин) с EGF и BSA в качестве контроля (все в концентрации 50 нг/мл). В, Γ – денситометрический анализ полученных результатов. На рисунках приведены средние значения +/-SEM (N=3). *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 ANOVA Newman-Keuls test.

В присутствии BSA в среде культивирования pERK1/2 обнаруживался только в Neuro2a, экспрессирующих uPAR (рис.7Б, В). Введение EGF, лиганда EGFR, приводило к снижению содержания pERK1/2 в wt и uPAR↑ клетках в 7,8 и 20 раз, соответственно. В то же время, введение EGF, в 85 раз увеличивало уровень pERK1/2 в клоне #6, (рис.7В).

Известно, что связывание EGF с EGFR приводит к интернализации рецептора и его последующей деградации в лизосомах, что выражается в подавлении EGFR-зависимой сигнализации (Roepstorff et al., 2009). Возможно, снижение содержания pERK1/2 при введении EGF в среду культивирования uPAR-содержащих клеток вызвано более высокой скоростью интернализации EGFR с поверхности клеточной мембраны. В ядерной фракции значительных различий в уровне pERK не обнаружили (рис.7А, Б, Г). Данный результат показывает, что снижение уровня цитоплазматического pERK1/2 не связано с его транслокацией в ядро, а возможно подчиняется действию цитоплазматических фосфатаз (DUSP) (Zou et al., 2018).

Таким образом, полученные данные указывают на взаимосвязь uPAR с EGFR, а также на участие uPAR в регуляции EGFR-ERK1/2 сигнального пути. Известно, что ERK1/2 играет важную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток (Michailovici et al., 2014). В этой связи далее мы оценили скорость роста нейритов в зависимости от активации EGFR и экспрессии uPAR в Neuro2a.



Рисунок 9. Длина нейритов и число Neuro2a клеток с нейритами в зависимости от экспрессии uPAR и активации EGFR. Длину нейритов оценивали с помощью системы IncuCyte® и плагина Neurotrack. По оси ординат приводится длина нейритов, нормированная на площадь, занимаемую телами клеток (в мм/мм²). Данные представлены как среднее значение +/-SEM (N=4-5 лунки на группу, по 100 клеток на лунку). Длины нейритов в контрольных клетках (wt), клетках с нокаутом *uPAR* (#6) и клетках гиперэкспрессирующих uPAR (uPAR↑). А – при введении 20 мкМ AG1478; Б – при введении 0,2% DMSO; В – при введении 50 нг/мл EGF; Г – при введении 50 нг/мл BSA. Д, Е – процент клеток с нейритами через 120 ч (3 поля зрения, 200-400 клеток на поле зрения). *p <0,05 на 24 ч uPAR↑ от #6; wt от #6, между uPAR↑ и wt отличий нет. *** p <0,001 на 36 ч uPAR↑ от #6; wt от #6, между uPAR↑ и wt отличий нет. **** p <0,0001 ANOVA Tukey's test.

В контрольных условиях клетки uPAR↑ имеют самые длинные нейриты (DMSO или BSA), тогда как в клетках с нокаутом *uPAR* (клон #6) вообще не растут нейриты (в течение 48 ч) (рис.9Б, Г), что также согласуется с нашими ранее полученными результатами, при которых подавление экспрессии uPAR снижает длину нейритов. Активация EGFR стимулирует скорость роста нейритов в uPAR↑ клетках (24 ч): длина нейритов в этих клетках в 2 раза больше, чем в wt клетках и клоне #6 (р <0,05) (рис.9В). К 36 ч длины нейритов в wt и uPAR↑ клетках одинаковые. Опосредованное AG1478 ингибирование активности EGFR не стимулирует рост нейритов в wt клетках и клоне #6, но не оказывает воздействие в uPAR↑ клетках (рис.9А). Мы предполагаем, что uPAR защищает Neuro2a от воздействия AG1478, поскольку именно uPAR↑ клетках происходит рост нейритов в присутствии ингибитора EGFR. Влияние EGF на длину нейритов было более выраженным в uPAR↑ клетках, что также указывает на то, что uPAR играет важную функциональную роль в нейритогенезе Neuro2a, который зависит от EGFR.

Наибольшее количество клеток с нейритами всегда наблюдалось в культурах клеток, экспрессирующих uPAR (wt и uPAR↑), а количество клеток с нейритами в клоне #6 было самым низким независимо от введения AG1478/DMSO или EGF/BSA (рис. 9Д). Длительное подавление активности EGFR (120 ч) при введении AG1478 вызывало увеличение длины нейритов во всех типах клеток вне зависимости от уровня экспрессии uPAR (wt, uPAR↑ и клон #6). Индукция роста аксонов под действием ингибитора EGFR была описана ранее как побочный эффект действия AG1478, вызывающего активацию внутри мембранного протеолиза p75(NTR) (Douglas et al., 2009). Вероятно, что в силу снижения экспрессии p75(NTR) в клетках #6 (рис.12E), снижается также их спонтанная дифференцировка. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при нокаут uPAR снижает дифференцировку в Neuro2a, поскольку снижает длину нейритов и их формирование (рис. 9), а также меняется характер роста нейритов, который начинается позже, чем в wt и uPAR↑ клетках и выражен только при подавлении активности EGFR. Можно предположить, что экспрессия uPAR оказывает влияние на более ранние этапы формирования нейритов, так как различий в длине нейритов через 120 ч инкубации в присутствии EGF выявлено не было (данные в диссертации). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что uPAR является важным регулятором дифференцировки Neuro2a клеток и опосредует свое действие через тирозинкиназный рецептор EGFR и его нисходящий сигнальный посредник ERK1/2.

2.3. Снижение экспрессии uPAR ингибирует пролиферацию клеток Neuro2a и активирует апоптоз

Далее мы оценили пролиферацию Neuro2a с нокаутом *uPAR*. Оказалось, что клон #6 и клон со значительным подавлением uPAR (#30) характеризуются снижением пролиферативной активности (рис.10А), сопровождаемой уменьшением уровня экспрессии ki-67 - маркера активных фаз клеточного цикла (G1, G2, S), (рис.11).

Кроме того, в клонах #6 и #30 повышается уровень активной каспазы 3 и появляется низкомолекулярный (89 кДа) фрагмент фермента PARP-1, который является прямой мишенью каспазы 3 (рис.10Б). Эти данные свидетельствуют о том, что нокаут *uPAR* снижает пролиферацию и вызывает апоптотическую гибель Neuro2a.



Рисунок 10. Нокаут *uPAR* снижает пролиферацию Neuro2a клеток и активирует апоптоз. А - контрольные Neuro2a wt; #6 - клон с нокаутом *uPAR*, #30 - клон со значительным подавлением uPAR. Данные представлены как среднее ±SEM (N=3 лунки на группу).* - p<0,001 по сравнению с контролем, ** - p<0,05 по сравнению с контролем (тест Ньюмана-Кейлса). Б – уровень содержания каспазы-3 и PARP-1 в лизатах Neuro2a методом иммуноблоттинга. В качестве контроля загрузки использовали винкулин.



Рисунок 11. Нокаут uPAR уменьшает количество ki-67-положительных клеток. А, Б, В – диаграммы показывают уровень экспрессии ki-67 в клоне с нокаутом *uPAR* (#6), клоне со значительным подавлением uPAR (#30) и в контрольных клетках wt после 24, 48 и 72 ч в среде культивирования, содержащей 1% FBS. Данные представлены как среднее значение ±SD (N=3 лунки на группу), *p <0,05 тест ANOVA.

2.4. Нокаут иPAR снижает экспрессию TrkC и изменяет МАРК-зависимую сигнализацию в Neuro2a клетках

Один из механизмов, с помощью которого uPAR может регулировать выживаемость Neuro2a, заключается в изменении внутриклеточной сигнализации с участием рецепторных тирозиновых киназ (Trk). Показано, что рецепторы нейротрофинов

участвуют в дифференцировке и выживаемости нейронов (Bartkowska et al., 2007). Нами было обнаружено, что при нокауте *uPAR* снижается уровень мPHK полноразмерной формы TrkC (рецептора нейротрофина NT3) (рис.12Б). Полноразмерная форма TrkC имеет внутриклеточный тирозинкиназный домен для сопряжения с MAPK-зависимой и PIK3/Akt сигнальной системой клетки. При этом мPHK усеченной изоформы TrkC, которая является ловушкой сигнальных эффектов NT3, не изменялась (рис.12В).



Рисунок 12. Анализ уровня экспрессии мРНК рецепторных тирозиновых киназ в клетках Neuro2a. А – уровень мРНК TrkC в wt и клоне #6; Б – уровень мРНК полноразмерной формы TrkC в wt и клоне #6; В - уровень мРНК усеченной формы TrkC в wt и клоне #6. Данные представлены как среднее ± SD (N=3 лунки на группу), **p<0,02; *** p<0,05 (по t-тесту Стьюдента). Уровень мРНК нормировали на экспрессию гена *b-актина*.

Далее мы оценили активацию PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2 и p38MAPK – сигнальных посредников TrkC в клетках Neuro2a с нокаутом по гену *uPAR* и контрольных wt.



Рисунок 13. Анализ уровня активации ERK1/2, Akt и p38 методом иммуноблоттинга в клетках Neuro2a. A – анализ содержания pERK1/2, ERK1/2, pAkt (T308) и pAkt(S473), Akt, p-p38 и p38 в клоне #6 с нокаутом *uPAR* и wt клетках (N=3) методом иммуноблоттинга. В качестве контроля белковой загрузки использовали β3-тубулин. Б, В, Г, Д – денситометрический анализ изображений с помощью программы *ImageJ*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показана роль рецептора урокиназы в регуляции пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток Neuro2a, а также выявлен возможный молекулярный механизм, лежащий в основе этих эффектов и заключающийся в uPAR-зависимой регуляции активности рецепторных тирозиновых киназ – EGFR и TrkC и нисходящей внутриклеточной сигнализации с участием ERK1/2 и Akt (рис.14).



Рисунок 14. Предполагаемый механизм участия uPAR в дифференцировке и выживаемости Neuro2a клеток.

выводы

1. Получена линия клеток Neuro2a, стабильно гиперэкспрессирующая uPAR. С использованием технологии CRISPR/Cas9n получены клоны клеток Neuro2a с подавленной экспрессией uPAR или нокаутные по гену *uPAR*.

2. Активность uPAR опосредует направленный рост нейритов и выживаемость Neuro2a. Блокирование активности uPAR вызывает формирование нейритов и усиливает их ветвление, сопровождаемое повышением экспрессии RIT1 и MAP2 – белков, ответственных за ветвление аксонов. Длительное блокирование uPAR активирует киназы Akt (S473) и p38, снижает экспрессию маркера дифференцировки и выживаемости нейронов NeuN и приводит к гибели клеток по механизму деградации ДНК с участием белка PARP-1.

3. Экспрессия uPAR поддерживает дифференцировку и выживаемость Neuro2a. При нокауте *uPAR* снижается пролиферация Neuro2a и рост нейритов, что сопровождается снижением pERK1/2, ki67 (маркера пролиферации) и активацией апоптоза (каспаза-3 и белок PARP-1).

20

4. uPAR определяет активацию сигнализации с участием EGFR и ERK1/2 и механизмы клеточного ответа Neuro2a. Экспрессия и активность uPAR вызывает фосфорилирование EGFR и ERK1/2 и стимулирует рост нейритов. При подавлении активности uPAR или нокауте uPAR уменьшается содержание активных форм EGFR и ERK1/2 и падает выживаемость клеток.

5. Нокаут *uPAR* снижает содержание мРНК полноразмерного TrkC и его посредника pAkt (T308).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. <u>Rysenkova K.D.</u> Urokinase receptor deficiency results in EGFR-mediated failure to transmit signals for cell survival and neurite formation in mouse neuroblastoma cells / Rysenkova K.D., Klimovich P.S., Shmakova A.A., Karagyaur M.N., Ivanova K.A., Aleksandrushkina N.A., Tkachuk V.A., Rubina K.A., Semina E.V. // Cellular Signalling. – 2020. – V. 75. 109741. IF (Scopus) – 3,968 doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109741.

2. Semina E.V. Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma / Semina E.V., Rubina K.A., Shmakova A.A., <u>Rysenkova K.D.</u>, Klimovich P.S., Aleksanrushkina N.A., Sysoeva V.Yu, Karagyaur M.N., Tkachuk V.A. // Journal of Cellular Physiology. – 2020. – V. 235, № 9. – P. 6268-6286. IF (WoS, Scopus) – 4,018.

3. Klimovich P.S. Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with α 5 β 1 integrin / Klimovich P.S., Semina E.V., Karagyaur M.N., <u>Rysenkova K.D.</u>, Sysoeva V.Yu, Mironov N.A., Sagaradze G.D., Az'muko A.A., Popov V.S., Rubina K.A., Tkachuk V.A. // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2020. – V. 125, No 1. P. 1-20. IF (WoS, Scopus) – 3,743.

4. Shmakova A.A. Urokinase receptor and tissue plasminogen activator as immediate early genes in pentylenetetrazole induced seizures in the mouse brain / Shmakova A.A., Rubina K.A., <u>Rysenkova K.D.</u>, Gruzdeva A.M., Ivashkina O.I., Anokhin K.V., Tkachuk V.A., Semina E.V. // European Journal of Neuroscience. – 2019. – V. 51, № 7. – P. 1559-1572. IF (WoS) – 2,832.

5. Dyikanov D.T. Optimization of CRISPR/Cas9 technology to knock-out genes of interest in aneuploid cell lines / Dyikanov D.T., Vasiluev P.A., <u>Rysenkova K.D.</u>, Aleksandrushkina N.A., Tyurin-Kuzmin P.A., Kulebyakin K.Y., Rubtsov Y.P., Shmakova A.A., Evseeva M.N., Balatskiy A.V., Semina E.V., Rostovtseva A.I., Makarevich P.I., Karagyaur M.N. // Tissue Engineering - Part C: Methods. – 2019. – V. 25, №3. – P. 168-175. IF (WoS) – 2,638.

6. <u>Rysenkova K.D.</u> CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation / Rysenkova K.D., Semina E.V., Karagyaur M.N., Shmakova A.A., Dyikanov D.T., Vasiluev P.A., Rubtsov Y.P., Rubina K.A., Tkachuk V.A. // Oncotarget. – 2018. – V. 9, № 50. – P. 29414-29430. IF (WoS, 2016) – 5,168; IF (Scopus, 2018) – 1,575, Q1.

7. <u>Рысенкова К.Д.</u> Использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии гена урокиназного рецептора в клетках нейробластомы / Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Карагяур М.Н., Шмакова А.А., Дыйканов Д.Т., Рубина

К.А., Ткачук В.А. // Технологии живых систем. – 2018. – V. 15, №1. – Р. 10-19. IF (РИНЦ) – 0,187.

8. Semina E.V. IL-6 orchestrates the migration of urokinase receptor-deficient neuroblastoma cells / Semina E.V., <u>Rysenkova K.D.</u>, Rubina K.A., Tkachuk V.A. // **Онтогенез.** -2018. - V. 49, No 4S. - P. 40-41. IF (РИНЦ) - 0,910.

9. Semina E.V. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching / Semina E.V., Rubina K.A., Sysoeva V.Y., <u>Rysenkova K.D.</u>, Klimovich P.S., Plekhanova O.S., Tkachuk V.A. // Eur J Cell Biol. – 2016. – V. 95, № 9. – P. 295-310. IF (Scopus) – 3,024.

10. Белоглазова И.Б. Молекулярное моделирование – новый подход к разработке ингибиторов урокиназы / Белоглазова И.Б., Плеханова О.С., Каткова Е.В., <u>Рысенкова К.Д.</u>, Стамбольский Д.В., Сулимов В.Б., Ткачук В.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158, № 11. – С. 655-659. IF (Scopus) – 0,6; IF (РИНЦ) – 0,657.

11. <u>Рысенкова К.Д.</u> Роль урокиназной системы в канцерогенезе и метастазировании опухолевых клеток с участием микроРНК / Рысенкова К.Д., Рубина К.А., Иванова К.А., Карагяур М.Н., Семина Е.В. // Гены и Клетки. Материалы IV Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. – 2019. – Т. 14. – С. 200, Москва.

12. <u>Рысенкова К.Д.</u> Молекулярные механизмы участия рецептора урокиназы и EGFR в пролиферации и дифференцировке клеток нейробластомы / Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Климович П.С., Рубина К.А., Ткачук В.А. // АСТА NATURAE (Спецвыпуск). – 2019. – Т. 1. – С. 72. IF (РИНЦ) – 2,872.

13. <u>Рысенкова К.Д.</u> Нокаут гена урокиназного рецептора (PLAUR) с помощью CRISPR/Cas9 для снижения пролиферации и инвазии нейробластомы / Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Карагяур М.Н., Шмакова А.А., Рубина К.А., Ткачук В.А. // Гены и клетки. Материалы «Международного конгресса CRISPR2018». – 2018. – С. 45-46, Новосибирск.

14. Карагяур М.Н. Создание плазмидных и вирусных векторов для knock-in/out модификаций генома эукариотических клеток / Карагяур М.Н., Васильев П.А., <u>Рысенкова К.Д.</u>, Семина Е.В. // Редактирование генов и геномов, 2-е изд. – 2018. – Т. 3. – С. 37-58, Новосибирск.

15. <u>Rysenkova K.D.</u> Urokinase receptor involved in differentiation and regulation of neuronal survival / Rysenkova K.D., Klimovich P.S., Semina E.V., Rubina K.A., Tkachuk V.A. // Fourth biennial German-Russian symposium Joint meeting of the Berlin-Brandenburg Academy of Sciences and Humanities and Russian Academy of Sciences. – 2017. – C. 48-48, Moscow.

16. <u>Рысенкова К.Д.</u> Использование технологии CRISPR/CAS9 для выключения экспрессии гена урокиназного рецептора в нейробластоме / Рысенкова К.Д., Шмакова А.А., Семина Е.В., Рубина К.А., Карагяур М.Н., Рубцов Ю.П., Дыйканов Д.Т., Ткачук В.А. // Гены и клетки. Материалы III национального конгресса по регенеративной медицине. – 2017. – Т. 12, №3. – С. 219-220, Москва.

17. <u>Рысенкова К.Д.</u> Эффективность использования системы CRISPR/Cas9 для делеции гена урокиназного рецептора в нейробластоме / Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Карагяур М.Н., Шмакова А.А., Дыйканов Д.Т., Ткачук В.А. // «Рецепторы и внутриклеточная

сигнализация». Сборник статей под редакцией В.П. Зинченко и А.В. Бережнова. – 2017. – Т. 1. – С. 445-450, Пущино.

18. <u>Рысенкова К.Д.</u> Участие урокиназной системы в дифференцировке и выживаемости нейронов / Рысенкова К.Д., Климович П.С., Семина Е.В., Рубина К.А., Ткачук В.А. // ACTA NATURAE. – 2016. – С. 48-49.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AG1478 – тирфостин, высокоспецифичный ингибитор EGFR (IC50 = 3 nM)

Akt – протеинкиназа В

ВС 11 гидробромид – 4-борофенилметиловый эфир гидроксибромида, ингибитор протеолитической активности урокиназы (IC₅₀ = 8.2 µM)

BSA – бычий сывороточный альбумин

CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

Cas9 – CRISPR-ассоциированный белок, эндонуклеаза (CRISPR associated protein 9)

CRISPR/Cas9n - система редактирования генома, включающая никазу Cas9

DAPI-4, 6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM – Среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium) DMSO – диметилсульфоксид

DUSP – фосфатаза двойной специфичности

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor)

EGFP – зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein)

ERK1/2 – протеинкиназы, активируемые внеклеточными сигналами

FBS – фетальная бычья сыворотка

FITС – флуоресцеин изотиоцианат

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

МАР2 – белок, ассоциированный с микротрубочками 2

NeuN – ядерный белок, маркер зрелых нейронов

Neuro2a – культура клеток нейробластомы мыши

NF200 – белок нейрофиламентов с мол. массой 200 кДа

РАRР-1 – поли (АДФ-рибоза) полимераза-1

р38 – митоген-активируемая протеинкиназа

P75NTR – рецептор нейротрофинов p75 (p75 neurotrophin receptor)

RIT – GTP-связывающий белок (GTP – гуанозинтрифосфат)

sg1, sg2 – гидовые РНК, специфичные последовательности ДНК в 5'-НТО и первом экзоне гена *иРАR*

TrkA – рецептор фактора роста нервов (NGF) (tropomyosin receptor kinase A)

TrkB – рецептор мозгового нейротрофического фактора роста (BDNF)(tropomyosin receptor kinase B)

TrkC – рецептор нейротрофина-3 (tropomyosin receptor kinase C)

uPA – активатор плазминогена урокиназного типа, урокиназа

uPAR – рецептор урокиназы

uPAR↑ – клетки Neuro2a, гиперэкспрессирующие uPAR

wt – контрольные клетки Neuro2a (wild type)

5'-НТО – 5'-нетранслируемая область

#6 – клетки Neuro2a с нокаутом *uPAR*