

# Роль Plaur-miR1-5p, кодируемой геном урокиназного рецептора *Plaur*, в процессах ангиогенеза

П.С. Климович<sup>1,2</sup>, А.В. Реутов<sup>1</sup>, А.А. Щипова<sup>1</sup>, В.Ю. Сысоева<sup>1</sup>, М.С. Арбатский<sup>4</sup>,  
К.А. Рубина<sup>1</sup>, Е.В. Семина<sup>1,3</sup>

- <sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия
- <sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, 121552 г. Москва, ул. Академика Чазова, 15а, Россия
- <sup>3</sup> «Балтийский федеральный университета им. И. Канта», 236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6, Россия
- <sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, РГНКЦ, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Россия.

Адрес для корреспонденции: [lex2050@mail.ru](mailto:lex2050@mail.ru)

## Аннотация

Ангиогенез необходим при регенерации органов и тканей, поскольку кровеносные сосуды обеспечивают снабжение питательными веществами и кислородом. Внеклеточные везикулы, секретируемые мезенхимальными стволовыми/стромальными клетками, принимают активное участие в стимуляции процессов ангиогенеза счет содержащихся в них проангиогенных факторов роста и микроРНК. МикроРНК, короткие некодирующие молекулы РНК, играют ключевую роль в ангиогенезе, регулируя пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и миграцию эндотелиальных клеток, а также экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. В настоящей работе мы оценили влияние внеклеточных везикул, содержащих микроРНК Plaur-miR1-5p, на ранние этапы ангиогенеза, а именно на миграцию/пролиферацию сосудистых клеток и формирование капиллярноподобных структур. Plaur-miR1-5p была открыта нами недавно, она экспрессируется с гена урокиназного рецептора (*Plaur*), однако ее функции остаются не изученными. Мы показали, что Plaur-miR1-5p входит в состав внеклеточных везикул и регулирует формирование капиллярноподобных структур на модели сосудистого колечка в Матригеле. Используя биоинформатический анализ, мы идентифицировали возможные гены-мишени Plaur-miR1-5p, вовлеченные в регуляцию ангиогенеза. Данное исследование углубляет понимание фундаментальных процессов регуляции ангиогенеза с участием внеклеточных везикул и содержащихся в них микроРНК, а также расширяет наши представления о функции гена *Plaur*.

**Ключевые слова:** микроРНК, урокиназный рецептор, ангиогенез, uPAR, внеклеточные везикулы, мезенхимальные стволовые клетки, Plaur

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Климович П.С., Реутов А.В., Щипова А.А., Сысоева В.Ю., Арбатский М.С., Рубина К.А., Семина Е.В. Роль Plaur-miR1-5p, кодируемой геном урокиназного рецептора *Plaur*, в процессах ангиогенеза. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):60–75. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-60-75>

Поступила 09.08.2022

Обработана 23.05.2023

Принята к публикации 20.06.2023

Onlinefirst: 26.12.2023

# The role of Plaur-miR1-5p encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*) in angiogenesis

Polina S. Klimovich<sup>1,2</sup>, Artem V. Reutov<sup>1</sup>, Anna A. Shchipova<sup>1</sup>, Veronika Yu. Sysoeva<sup>1</sup>, Mikhail S. Arbatsky<sup>4</sup>, Kseniya A. Rubina<sup>1</sup>, Ekaterina V. Semina<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Correspondence address: [lex2050@mail.ru](mailto:lex2050@mail.ru)

## Abstract

Angiogenesis plays a crucial role in tissue and organ regeneration by supplying essential nutrients and oxygen through the development of new blood vessels. Mesenchymal stem/stromal cells release extracellular vesicles that actively contribute to angiogenesis by carrying pro-angiogenic growth factors and microRNAs. MicroRNAs, small non-coding RNA molecules, are central players in angiogenesis, affecting endothelial cell proliferation, specialization, migration, apoptosis, and post-transcriptional gene expression.

In the present study, we investigated the impact of extracellular vesicles containing Plaur-miR1-5p microRNAs on angiogenesis, specifically focusing on its initial stages: vascular cell migration and the formation of capillary-like structures. Recently we discovered Plaur-miR1-5p, which is encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*). However, the functions of this microRNA remain largely unexplored. Using a vascular ring model embedded in Matrigel, we demonstrate that Plaur-miR1-5p is encapsulated within extracellular vesicles and plays a regulatory role in capillary-like structure formation. Moreover, applying bioinformatic analysis, we have identified potential target genes of Plaur-miR1-5p that participate in the regulation of angiogenesis.

This study advances our comprehension of the fundamental processes governing angiogenesis, particularly the involvement of extracellular vesicles and microRNAs. Moreover, it sheds light on the functional aspects of the *Plaur* gene, contributing to a more profound understanding of its role in regulation of angiogenesis.

**Keywords:** microRNA, urokinase receptor, angiogenesis, uPAR, extracellular vesicles, mesenchymal stem/stromal cells, *Plaur*

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Klimovich P.S., Reutov A.V., Shchipova A.A., Sysoeva V.Yu., Arbatsky M.S., Rubina K.A., Semina E.V. The role of Plaur-miR1-5p encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*) in angiogenesis. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):60–75. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-60-75>

Received: 01.03.2023

Revised: 23.05.2023

Accepted: 31.05.2023

Onlinefirst: 26.12.2023

**Список сокращений:**

ЭК — эндотелиальные клетки

ВВ — внеклеточные везикулы

МСК — мезенхимальные стволовые/стромальные клетки

МСК-ЖТ — мезенхимальные стволовые/стромальные клетки из жировой ткани

uPAR — урокиназный рецептор

uPA — урокиназа

ММР-2 — матриксная металлопротеиназа 2

ФБС — фетальная бычья сыворотка

DMEM — Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени

**Введение**

Ангиогенез естественным образом происходит в организме в эмбриогенезе и во взрослом организме, а также в ответ на повреждение, требующее восстановления кровоснабжения тканей и заживления ран. Образование новых кровеносных сосудов происходит за счет миграции, пролиферации и дифференцировки эндотелиальных клеток (ЭК), а также последующей стабилизации образовавшихся сосудистых отростков с участием перicyтов и гладкомышечных клеток [1]. Известно, что мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) принимают активное участие в процессах ангиогенеза посредством продукции целого ряда факторов роста, цитокинов и хемокинов в виде растворимых факторов или в составе внеклеточных везикул (ВВ) [2]. Локальное и системное введение МСК, выделенных из жировой ткани (МСК-ЖТ), способствует увеличению количества сосудов в тканях с нарушенным кровоснабжением, приводит к улучшению кровотока и уменьшению или исчезновению симптомов ишемии, что было показано на моделях ишемии конечности и инфаркта миокарда у экспериментальных животных [3].

Такие эффекты МСК в основном определяются их способностью секретировать ВВ. Считается, что ВВ являются наиболее важными участниками межклеточной коммуникации: они транспортируют различные биоактивные молекулы, которые далее могут эндоцитироваться соседними клетками, что запускает различные сигнальные каскады в клетках-реципиентах. Состав ВВ весьма разнообразен и зависит как от состояния клетки-донора, так и от ее микроокружения. ВВ принимают участие в фор-

мировании, росте и созревании сосудистой системы, а их потенциальное терапевтическое применение в регенеративной медицине и при заболеваниях, связанных с недостаточным ангиогенезом, вызывает растущий интерес [4]. Так, терапевтическое действие ВВ было продемонстрировано на модели инфаркта миокарда у крыс: было показано, что ВВ, продуцируемые МСК костного мозга, эндоцитируются ЭК, что стимулирует образование капилляроподобных структур *in vitro* и способствует ангиогенезу *in vivo* [5]. В основе этих эффектов лежит активация (NF)-κB сигнального пути, регулирующего транскрипцию генов проангиогенных белков [6]. Для ВВ, полученных из среды культивирования МСК-ЖТ, также было показано терапевтическое действие. В состав ВВ МСК-ЖТ входят такие факторы роста, как PDGF, FGF, EGF, VEGF, SCF и c-kit, которые стимулируют неоваскуляризацию, что приводит к улучшению функции сердца после ишемического повреждения на модели инфаркта миокарда у крыс [5, 7]. Однако наибольший интерес вызывают малые некодирующие РНК (микроРНК) в составе ВВ, имеющие широкий спектр функций в клетке, в том числе задействованных в регуляции процессов ангиогенеза.

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК (~22 нт), которые взаимодействуют с 3'-нетранслируемыми концами (UTR) мРНК-мишеней, ингибируя трансляцию [8]. ВВ, полученные из среды культивирования МСК-ЖТ, содержат большое разнообразие микроРНК различного спектра действия. Так, например, в состав ВВ от МСК-ЖТ входят микроРНК-31, которая имеет проангиогенные свойства и действует путем подавления

экспрессии фактора, ингибирующего HIF-1 $\alpha$  [9]. Другим примером является микроРНК-125, участвующая в спецификации лидирующих клеток (tip cell) путем подавления экспрессии дельта-подобного белка 4 (Dll4) — основного лиганда Notch-рецепторов и стимулирующая миграции эндотелиальных клеток [10]. Еще одним примером микроРНК, обнаруженной во ВВ от МСК-ЖТ и стимулирующей процессы ангиогенеза, является микроРНК-126-3p, регулирующая уровень Spred-1 в ЭК и вызывающая активацию ERK1/2 [11]. ВВ МСК-ЖТ могут содержать микроРНК, ингибирующие ангиогенез путем связывания мРНК положительных регуляторов. Так, например, микроРНК-222-3p, мишенью которой является ген STAT5a, вовлечена в отрицательное ремоделирование сосудов, опосредованное воспалением [12, 13].

В нашей лаборатории была идентифицирована неизвестная ранее микроРНК — *Plaur*-miR1, экспрессируемая с гена *Plaur* [14], однако ее участие в процессах ангиогенеза остается неясным. Урокиназный рецептор (uPAR), являясь частью системы активаторов плазминогена, фокусирует протеолитическую активность урокиназы (uPA), активатора плазминогена урокиназного типа, на поверхности ЭК, тем самым способствуя ангиогенезу. uPA при связывании с uPAR вызывает превращение плазминогена в плазмин, который разрушает внеклеточный матрикс, облегчая миграцию ЭК [15]. В литературе имеется большое количество публикаций, демонстрирующих участие uPAR в регуляции процессов ангиогенеза, включая такие механизмы, как индукция экспрессии матриксной металлопротеиназы 2 (MMP-2), активация рецептора VEGF 2 (VEGFR2; Flk-1/KDR), стимуляция формирования ламеллоподий за счет взаимодействия с витронектином и др. [16].

Также было обнаружено, что в отсутствие uPAR процессы ангиогенеза ингибируются. Так, в миокарде у мышей C57BL/129 (uPAR<sup>-/-</sup>) с нокаутом гена *Plaur* наблюдаются признаки васкулопатии: уменьшение количества капилляров/артериол, ремоделирование сосудистой стенки и отложение компонентов внеклеточного матрикса. Эти изменения коррелируют с увеличением экспрессии урокиназы и активных форм TGF- $\beta$ 1 [17]. Наблюдаемые множественные эффекты нокаута гена *Plaur* сложно объяснить одними лишь белковыми взаимодействиями, что позволило нам сделать предположение

о том, что эти процессы могут регулироваться на уровне экспрессии микроРНК с гена *Plaur*.

Таким образом, целью данной работы стало исследование влияния микроРНК *Plaur*-miR1 в составе ВВ МСК-ЖТ на процесс ангиогенеза. *Plaur*-miR1 экспрессируется с интронной области гена *Plaur* и процессируется с образованием двух зрелых форм микроРНК: *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p [18]. Ранее нами была обнаружена их экспрессия в нейтральных клетках и в головном мозге мыши [14].

В настоящей работе мы показали, что одна из зрелых форм (*Plaur*-miR1-5p) входит в состав ВВ от МСК-ЖТ. На эксплантной модели сосудистого колечка в Матригеле мы продемонстрировали, что ВВ от МСК-ЖТ стимулируют миграцию сосудистых клеток, и этот процесс является *Plaur*-зависимым. ВВ от МСК-ЖТ, выделенных из мышей, нокаутных по гену *Plaur*<sup>-/-</sup>, стимулируют миграцию сосудистых клеток еще сильнее, однако не оказывают стимулирующего эффекта на миграцию ЭК и формирование ими капиллярноподобных структур. Используя *in silico* алгоритм TargetScan для поиска предполагаемых мишеней исследуемой микроРНК (*Plaur*-miR1-5p), нами был предложен ряд генов-кандидатов, регулирующих процессы ангиогенеза. Полученные результаты указывают на сложность и многообразие не только белок-белковых взаимодействий в процессах ангиогенеза, но и на механизмы регуляции генов с участием микроРНК.

## Материалы и методы

### 1. Работа с животными

В работе использовали самцов мышей в возрасте 6 недель, лишенных гена *Plaur* (*Plaur*<sup>-/-</sup>) C57Bl6/SV129, и мышей дикого типа (WT) C57BL/6NTac RRID:MG1:5658006. Мышей содержали в виварии лаборатории трансляционной медицины ФФМ МГУ в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (Правила оборудования помещений и организации процедур). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Приказа № 267 Минздрава РФ «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19 июня 2003 г., «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Мышей использовали для получения брюшной аорты и жировой ткани с последующим выделением мезенхимных стволовых/

стромальных клеток (МСК) для наработки и выделения внеклеточных везикул.

## 2. Выделение и культивирование первичной культуры МСК мышей

Мышей WT и мышей *Plaur*<sup>-/-</sup> летально анестезировали внутрибрюшинным введением авертина и иммобилизовали на столике. Протирали кожу и шерсть животного спиртом, надрезали кожу в районе паха и продолжали разрез вдоль брюха. Фиксировали кожные лоскуты и собирали жировую ткань в пробирки объемом 1,5 мл с двукратным раствором антибиотика-антимикотика (NuClone, Новая Зеландия), приготовленном на буфере Хэнкса («ПанЭко», Россия). Для получения первичных МСК в стерильных условиях культурального бокса жировую ткань мышей фрагментировали до однородной массы в чашке Петри с небольшим количеством среды DMEM (Gibco, США), полученную суспензию подвергали ферментативной обработке с добавлением 200 ед/мл коллагеназы I типа и диспазы (40 ед/мл) (Worthington Biochemical, США) при 37 °С в течение 60 минут. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 200 g, осадок ресуспендировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки, 1-кратного раствора антибиотика-антимикотика. Клетки высеивали в одинаковом количестве (1×10<sup>5</sup> мл) в культуральные чашки Петри. Среду культивирования меняли каждые 3–4 дня. Все эксперименты были выполнены на клетках первых 5 пассажей.

## 3. Выделение и концентрирование внеклеточных везикул

После достижения клетками монослоя (примерно 48 ч после адгезии) клетки промывали буфером Хэнкса («ПанЭко», Россия), среду культивирования меняли на DMEM, содержащий сыворотку без экзосом (Fetal Bovine Serum, exosome-depleted Gibco). Через 48 ч среду культивирования собирали для последующего выделения ВВ. Полученную среду центрифугировали в течение 10 мин при 300 g для удаления клеточного дебриса. Для отделения и концентрирования фракции ВВ использовали метод ультрафильтрации на центриконах Vivaspın 20 (1000 кДа, Sartorius, Великобритания).

## 4. Характеристика внеклеточных везикул, секретируемых МСК мыши

Определение размера частиц и концентрацию ВВ проводили с помощью метода анализа траектории наночастиц (NTA) и прибора

ZetaView (Particle Metrix, Германия). Измерения проводили в режиме «бокового светорассеяния» при 25 °С. Для измерения использовали лазер с длиной волны 488 нм, объектив 10× и высокочувствительную камеру с матрицей КМОП-типа. Все измерения были выполнены в соответствии с рекомендациями стандарта ASTM E2834-12 с использованием протокола (SOP). Измерения каждого образца проводили в 5–10 повторах для достижения суммарного количества измеренных траекторий не менее 2500. Для обработки результатов и построения графиков использовали приложение ZetaView Analyzer (Particle Metrix, Германия).

## 5. Выделение брюшной аорты

Мышей дикого типа (WT) летально анестезировали внутрибрюшинным введением авертина, обескровливали путем декапитации и иммобилизовали на столике. Протирали кожу и шерсть животного спиртом. Удаляли кожу и делали боковые разрезы в зоне мечевидного отростка, стерильными инструментами отделяли аорту от соединительной ткани, проксимально отсекали на уровне аортальной дуги и дистально на уровне бифуркации. Выделенную аорту помещали в чашку Петри со стерильным охлажденным буфером Хэнкса, обескровливали и очищали от интимы. Все дальнейшие манипуляции осуществлялись в стерильных условиях.

## 6. Эксплантная модель *ex vivo* сосудистого колечка в Матригеле

Укомплектованную среду культивирования, содержащую однократный раствор антибиотика-антимикотика и EGM2M-2 BulletKit™, нагревали на водяной бане до температуры +37 °С. Размороженный Матригель (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, США) помещали на подложку со льдом. Одноразовым стерильным скальпелем разрезали аорту на 7–8 частей для получения сосудистых колечек. В лунки 8-луночных культуральных планшетов Nunc® Lab-Tek® Chambered Coverglass помещали каплю Матригеля объемом 100 мкл, смешанную в соотношении 1:1 с ВВ, полученными от МСК мышей дикого типа (Везикулы WT), либо с ВВ, полученными от МСК мышей с нокаутом гена *Plaur* (Везикулы *Plaur*<sup>-/-</sup>), либо со средой DMEM в качестве контроля. Далее стерильным пинцетом в каплю Матригеля помещали по одному сосудистому колечку так, чтобы эксплант располагался в середине объема капли. Планшет инкубировали 30 минут при +37 °С для полимеризации

Матригеля, затем вносили по 400 мкл предварительно нагретой укомплектованной среды и помещали в инкубатор. Культивировали в течение 5 суток.

#### **7. Визуализация при помощи фазово-контрастной микроскопии**

Изображения получали с помощью фазово-контрастного светового микроскопа Leica DMI 6000B, оснащенного цифровой камерой DFC 7000T и программой для анализа изображений LAS X (Leica Microsystems, Германия). Съемку проводили при увеличении 10×, масштабный отрезок — 750 нм.

#### **8. Иммунофлуоресцентное окрашивание**

Для предотвращения деполимеризации Матригеля все процедуры проводили при температуре 37 °С. Для иммунофлуоресцентного окрашивания экспланты промывали теплым фосфатно-солевым буфером («ПанЭко», Россия). Все растворы готовили на фосфатно-солевом буфере. Экспланты фиксировали в 4%-ном формальдегиде в течение 12 ч. После фиксации промывали буфером в течение 12 ч, затем пермеабелизировали 0,2%-ным Тритоном X-100 (Triton®X-100, Peroxide Free, Panreac, Испания) в течение 12 ч и повторяли промывку в буфере в течение 12 ч. Далее образцы обрабатывали 5%-ным BSA (Sigmaaldrich), содержащим 0,2% Тритона X-100, в течение 12 ч для блокирования неспецифического связывания. Затем образцы инкубировали в растворе первичных антител против VE-кадгерина (ID sc-9989, 1:500, SantaCruz, США) в течение 12 ч. После этого образцы промывали в буфере в течение 12 ч, инкубировали в растворе вторых антител AlexaFluor®488 (1:500, Molecular Probes, США). Ядра окрашивали DAPI (Sigma, США, 1:10 000). Для предотвращения контаминации образцы хранили в буфере, содержащем 0,001% азид натрия NaN<sub>3</sub>. Количество мигрирующих клеток оценивали с помощью конфокальной микроскопии с последующим анализом с помощью программы для анализа изображений (ImageJ, США).

#### **9. Визуализация при помощи конфокальной микроскопии**

Изображения получали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с помощью системы (TCS SP5, Leica, Германия), оснащенной объективом Plan-Apo ×20. DAPI и AlexaFluor®488, последовательно возбуждая лазерами с длиной

волны 405 и 488 нм соответственно. Все изображения были получены при одинаковых настройках конфокального усиления и смещения. Изображения (1024×1024 пикселя) сохраняли в формате TIFF в программе LeicaLAS. Изображения представлены в виде наложения зеленой и синей флуоресценции.

#### **10. Обработка микрофотографий сосудистого колечка**

Анализ изображений проводили в программе ImageJ. Миграцию сосудистых клеток оценивали с использованием двух показателей: площади, занимаемой мигрирующими/пролиферирующими клетками, и количества мигрирующих клеток из эксплантов в Матригель. На изображениях, полученных на фазово-контрастном микроскопе, оценивали площадь эксплантов и общую площадь с включением всех мигрирующих/пролиферирующих клеток. Площадь рассчитывали как разницу между двумя этими переменными. Оценку количества ЭК проводили посредством подсчета флуоресцирующих клеток, положительно окрашенных антителами на VE-cadherin и DAPI, на изображениях, полученных с помощью конфокального микроскопа.

#### **11. Полиаденилирование**

Для проведения реакции обратной транскрипции и последующего ПЦР в реальном времени выделенные микроРНК полиаденилировали. Для полиаденилирования использовали набор Poly(A) Polymerase NEB# M0276 (New England Biolabs, США) в соответствии с протоколом производителя. 5 мкг микроРНК ресуспендировали в 15 мкл воды свободной от нуклеаз, добавляли 2 мкл буфера для полимеразной реакции, 2 мкл АТФ и 1 мкл полимеразы. Инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

#### **12. Выделение микроРНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)**

Короткие РНК (малые РНК размером менее 200 нт, включая при-микроРНК, пре-микроРНК и зрелые микроРНК) выделяли из фракции BV коммерческим набором mirVana miRNA Isolation Kit (AM1560, Ambicon, Carlsbad, США) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора MMLV RT («Евроген», Россия)

в соответствии с протоколом производителя. Синтез кДНК проводили из 500 мкг РНК с использованием праймеров oligo-dT и random-dT. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) и системы детекции CFX96 (BioRAD) при следующих параметрах программы: начальная денатурация при 95 °C в течение 5 минут с последующими 40 циклами при 95 °C в течение 15 с, полимеризации праймеров при 57 °C 30 с и элонгации продукта при 72 °C в течение 10 с. *Snord95* использовали в качестве референсного гена. Относительную экспрессию рассчитывали при помощи метода  $\Delta\Delta C_t$ . Нормализацию проводили, принимая за единицу средний уровень транскрипта в контроле. Использовали следующие последовательности прямых праймеров: TGGTGATTGGCTGCCAGGTTС для *Plaur-miR1-5p*, AGAACCTGGCCGCAACA для *Plaur-miR1-3p*, AACACGTGCCAACAGTGATGAC для *Snord95*. В качестве обратного праймера использовали oligo-dT праймер.

### 13. Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в программе SigmaPlot версии 11.0. Сравнение между группами проводили при помощи One-Way ANOVA с последующим *post hoc* тестом Тьюки для множественных сравнений. Парные сравнения проводили с помощью *T*-теста Стьюдента. Статистически достоверными считались отличия при  $p < 0,05$ .

### 14. Биоинформатический поиск мишеней микроРНК

Для нуклеотидной последовательности микроРНК *Plaur-miR1-5p* 5'-UGGUGAUUGGCUGC-CAGGUUC-3' (идентифицирована ранее [14]) был проведен поиск мишеней с помощью базы данных TargetScan (Release 8.0) [19]. Алгоритм TargetScan идентифицирует в UTR-области сегменты, идеально комплементарные основаниям 2-8 микроРНК; далее расширяет каждую затравку дополнительными парами оснований и оптимизирует сопряжение оставшейся 3' части микроРНК с 35 основаниями UTR; присваивает свободную энергию сворачивания *G* каждому такому взаимодействию микроРНК с целевым сайтом; сортирует UTR по Z-баллу и присваивает каждому из них ранг  $R_i$ ; повторяет этот процесс для набора UTR; предсказывает в качестве мишеней те гены, для которых  $Z_i \geq Z_C$  и  $R_i \leq R_C$  для ортологичной последовательности UTR, где  $Z_C$  и  $R_C$  — заранее выбранные

значения Z-балла и ранга. Из всех параметров алгоритма TargetScan 2 использовался показатель контекста (Context++ score) [20], учитывающий дополнительные 14 характеристик факторов микроокружения. Таким образом, было найдено 7620 потенциальных мишеней, из которых для дальнейшего анализа была использована 761 мишень с величиной Context++ score выше 90.

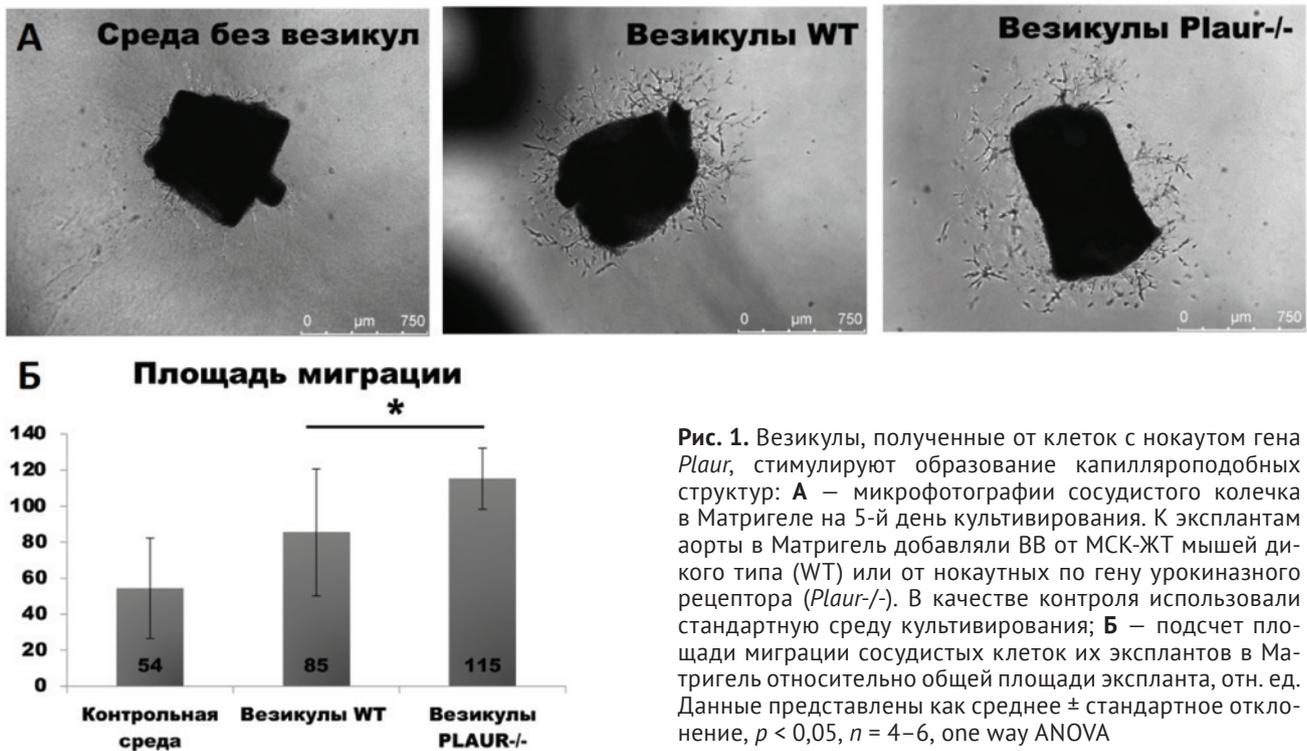
После этого была проведена кластеризация алгоритмом K-means 3 (алгоритм k-средних) [21]. 761 гена-мишени было выявлено с помощью базы данных STRING 4 [22].

При запуске алгоритма использовали различные значения *k*, однако при его значении, равном 3, в одном из трех полученных кластеров (226 генов) были сконцентрированы гены, относящиеся к GO:0072577 (Endothelial cell apoptotic process) (3 из 10 генов термина), GO:1905562 (Regulation of vascular endothelial cell proliferation) (5 из 31 генов термина), GO:0001525 (Angiogenesis) (12 из 346 генов термина), GO:0048514 (Blood vessel morphogenesis) (14 из 461 гена термина) и GO:0001568 (Blood vessel development) (17 из 568 генов термина).

## Результаты

### 1. Везикулы, полученные от клеток с нокаутом гена *Plaur*, стимулируют образование капилляроподобных структур

Влияние ВВ на рост и регенерацию сосудов оценивали на модели сосудистого колечка в Матригеле. Аорту мышей дикого типа культивировали в Матригеле с добавлением ВВ, полученных от клеток МСК-ЖТ, выделенных из мышей WT или *Plaur*<sup>-/-</sup>, в течение 5 дней. Далее проводили съемку на фазово-контрастном микроскопе для оценки формирования капилляроподобных структур. Рассчитывали площадь зоны миграции сосудистых клеток из эксплантов в Матригель относительно общей площади экспланта. При анализе оказалось, что ВВ WT достоверно стимулируют миграцию сосудистых клеток по сравнению с контролем (среда без везикул). При этом площадь миграции клеток после добавления ВВ от МСК-ЖТ из *Plaur*<sup>-/-</sup> мышей была максимальной по сравнению с контролем (среда без везикул) и с ВВ от МСК мышей WT. Эти данные свидетельствуют о том, что в отсутствие гена *Plaur* наблюдается максимальная миграция сосудистых клеток на модели сосудистого колечка (рис. 1).



**Рис. 1.** Везикулы, полученные от клеток с нокаутом гена *Plaur*, стимулируют образование капилляроподобных структур: **А** – микрофотографии сосудистого колечка в Матригеле на 5-й день культивирования. К эксплантам аорты в Матригель добавляли ВВ от МСК-ЖТ мышей дикого типа (WT) или от нокаутных по гену урокиназного рецептора (*Plaur*<sup>-/-</sup>). В качестве контроля использовали стандартную среду культивирования; **Б** – подсчет площади миграции сосудистых клеток их эксплантов в Матригель относительно общей площади экспланта, отн. ед. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение,  $p < 0,05$ ,  $n = 4-6$ , one way ANOVA

## 2. Везикулы от мышей дикого типа, но не *Plaur*<sup>-/-</sup>, стимулируют миграцию эндотелиальных клеток

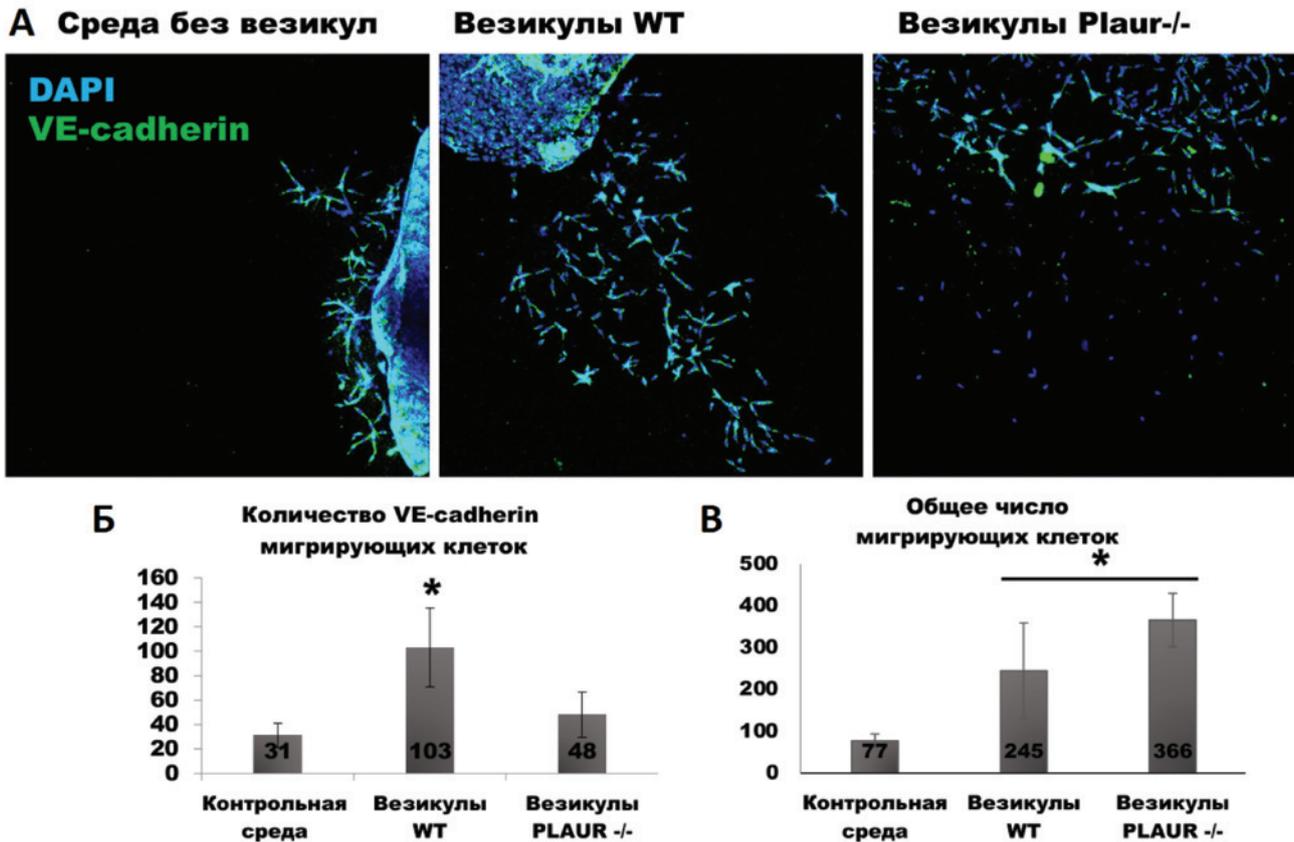
Далее полученные экспланты сосудистого колечка окрашивали антителами к VE-кадгерину для иммунофлуоресцентного анализа миграции/пролиферации ЭК. Оценивали количество VE-кадгеринпозитивных клеток относительно общего числа клеток (рис. 2). Оказалось, что ВВ от МСК-ЖТ WT мышей достоверно стимулировали миграцию/пролиферацию VE-кадгеринпозитивных ЭК по сравнению с контрольной средой, в отличие от ВВ *Plaur*<sup>-/-</sup>, которые таким действием не обладали. Однако при подсчете общего числа клеток оказалось, что данный показатель выше в группе ВВ *Plaur*<sup>-/-</sup> по сравнению с ВВ WT и контрольной средой.

Возможным объяснением данного феномена может являться то, что в выбранной экспериментальной модели помимо ЭК из эксплантов также мигрируют гладкомышечные клетки, перициты и МСК. Вероятно, нокаут гена *Plaur*<sup>-/-</sup> приводит к изменению состава ВВ таким образом, что они теряют способность стимулировать образование капилляроподобных структур ЭК, но приобретают способность стимулировать миграцию/пролиферацию остальных клеток. Такое разнонаправленное действие ВВ может

объясняться изменением в составе микроРНК, являющихся их важным компонентом.

## 3. Идентификация микроРНК *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p в составе везикул, секретируемых МСК-ЖТ

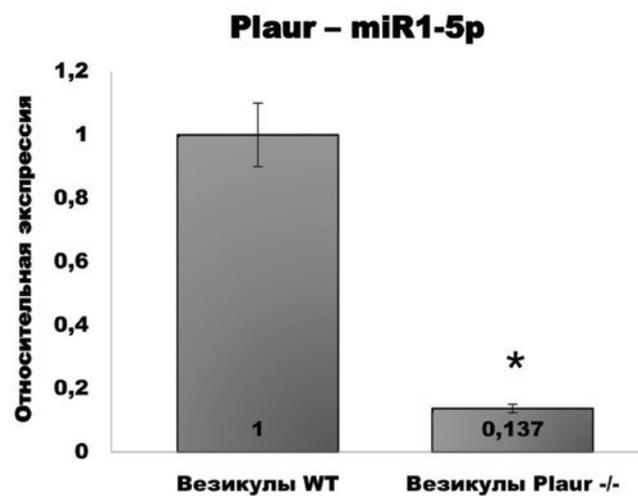
Обнаружив различия в действии ВВ, полученных из МСК-ЖТ мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену урокиназного рецептора (*Plaur*<sup>-/-</sup>), мы предположили, что это может быть связано с изменением состава микроРНК в самих ВВ. Ранее в клетках нейрального происхождения Neuro2A и головном мозге мыши нами была идентифицирована при-микроРНК *Plaur*-miR1, экспрессируемая с гена урокиназного рецептора *Plaur* [14] и процессируемая с образованием двух зрелых форм: микроРНК *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p. Чтобы проверить это предположение, мы выделили фракцию микроРНК из ВВ от МСК из мышей WT и *Plaur*<sup>-/-</sup> и проанализировали в ней экспрессию *Plaur*-miR1-5p и *Plaur*-miR1-3p методом ПЦР-РВ. *Plaur*-miR1-5p была обнаружена в ВВ WT, но не *Plaur*<sup>-/-</sup>, что дополнительно подтверждает зависимость ее экспрессии от наличия гена урокиназного рецептора и позволяет предположить ее роль в регуляции миграции сосудистых клеток (рис. 3). *Plaur*-miR1-3p в ВВ обнаружена не была, что позволяет предположить только ее внутриклеточную функцию.



**Рис. 2.** Везикулы WT, но не *Plaur*<sup>-/-</sup>, стимулируют миграцию и(или) пролиферацию эндотелиальных клеток: **А** – иммунофлуоресцентное окрашивание эксплантов сосудистого колючка в Матригеле антителами к VE-кадгерину (зеленая флуоресценция). Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок 100 нм; **Б** – подсчет количества промигрировавших VE-кадгерин-позитивных клеток из экспланта в Матригель; **В** – подсчет общего количества мигрирующих клеток. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ , one way ANOVA

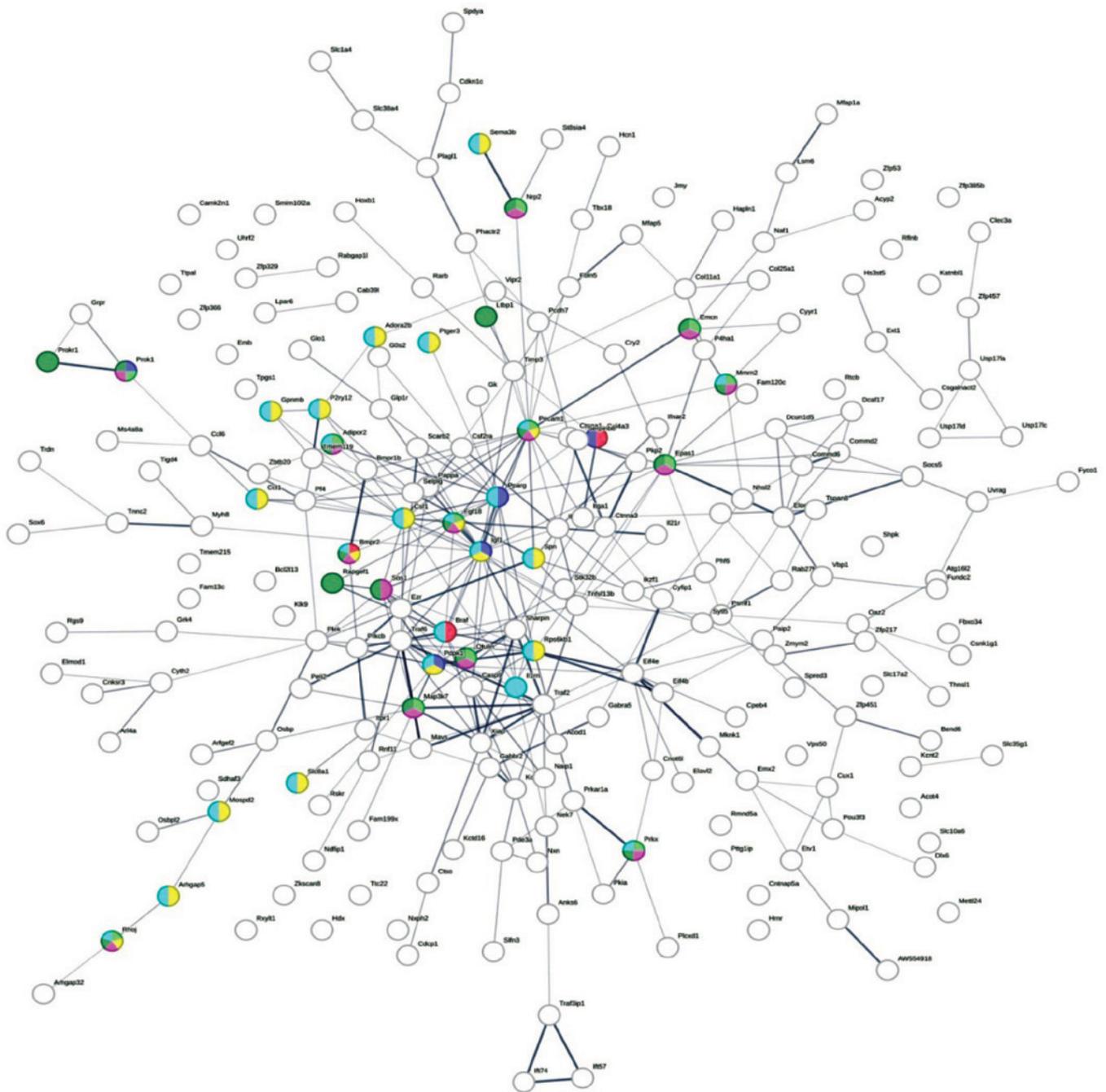
### 3. Биоинформатический поиск мишеней микроРНК Plaur-mir1-5p, ассоциированных с ангиогенезом

Предположив, что Plaur-mir1-5p может быть регулятором миграции и/или пролиферации сосудистых и, в частности, ЭК, мы провели биоинформатический поиск возможных генов-мишеней изучаемой микроРНК. Для поиска мишеней использовали онлайн-сервис TargetScan, который идентифицировал 7621 мишень. Для дальнейшего процессирования были выбраны мишени с показателем связывания не менее 0,9 (дополнительные материалы, табл. 1). Далее была проведена кластеризация алгоритмом K-means 1 (алгоритм *k*-средних) 761 гена-мишени в 3 кластера с помощью базы данных STRING. В первом кластере сконцентрировались гены, регулирующие синаптическую пластичность, во втором – метаболизм, в третьем кластере сосредоточились гены (22 гена), относящиеся к GO:0072577 (Endothelial cell apoptotic process), GO:1905562



**Рис. 3.** Анализ содержания микроРНК Plaur-mir1-5p во ВВ, выделенных из среды культивирования МСК-ЖТ методом ПЦР-РВ. Данные рассчитаны методом  $\Delta\Delta Ct$  и представлены как среднее ± стандартное отклонение,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ , T-test





Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0072577	Endothelial cell apoptotic process	3 of 10	1.46	0.0373
GO:1905562	Regulation of vascular endothelial cell proliferation	5 of 31	1.19	0.0082
GO:0001525	Angiogenesis	12 of 346	0.53	0.0435
GO:0048514	Blood vessel morphogenesis	14 of 461	0.47	0.0475
GO:0001568	Blood vessel development	17 of 568	0.46	0.0208

Рис. 4. Кластеризация мишеней *Plaur*-miR1-5p алгоритмом K-means. На рисунке представлен третий из кластеров, включающий гены, относящиеся к GO:0072577 (Endothelial cell apoptotic process), GO:1905562 (Regulation of vascular endothelial cell proliferation), GO:0001525 (Angiogenesis), GO:0048514 (Blood vessel morphogenesis) и GO:0001568 (Blood vessel development) (выделены цветом).

коррелируют с такими заболеваниями человека, как эпилепсия, аутизм, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и опухоли головного мозга [25]. В связи с этим мы предположили, что ранее неизвестные микроРНК, расположенные в интронных последовательностях гена *Plaur*, могут определять целый ряд эффектов, связанных с геном *Plaur*, которые нельзя объяснить только функцией белка uPAR.

В нашей лаборатории была идентифицирована абсолютно новая микроРНК *Plaur-miR1*, которая экспрессируется с гена *Plaur* и процессируется с образованием двух зрелых форм: *Plaur-miR1-3p* и *Plaur-miR1-5p*. Однако функции данных микроРНК в настоящий момент остаются неизученными.

Известно, что микроРНК регулируют экспрессию генов на уровне трансляции, связываясь 3' участками РНК как в самой клетке-доноре, так и в составе ВВ, оказывая действие на соседние клетки [26]. В настоящем исследовании мы проверили, входят ли изучаемые микроРНК (*Plaur-miR1-3p* и *Plaur-miR1-5p*) в состав ВВ и какую роль они могут играть в регуляции процессов ангиогенеза. В работе использовали ВВ, полученные от клеток МСК-ЖТ. Известно, что ВВ МСК содержат целый ряд ангиогенных факторов и являются положительными регуляторами роста сосудов [2]. Клетки МСК выделяли из жировой ткани мышей дикого типа и нокаутных по гену *Plaur*. Известно, что при нокауте урокиназного рецептора *Plaur-miR1-3p* и *Plaur-miR1-5p* не экспрессируются [14]. Методом ПЦР в реальном времени мы показали, что одна из изучаемых микроРНК, а именно *Plaur-miR1-5p*, входит в состав ВВ МСК-ЖТ (рис. 3). Отличия в регуляции и функциях 3p и 5p микроРНК до сих пор недостаточно изучены. Например, имеются данные литературы о том, что одна из цепей может являться менее стабильной и лишь «направляющей», необходимой для того, чтобы микроРНК проходила процессинг комплексом RISC, после чего она деградирует. В то же время другие данные литературы свидетельствуют о том, что каждая из цепей микроРНК может быть стабильна и имеет свои мишени [27]. Возможно, *Plaur-miR1-5p* более стабильна, чем *Plaur-miR1-3p*, благодаря чему может быть упакована в мультивезикулярные тельца [27]. В дальнейшем *Plaur-miR1-5p* может быть транспортирована в соседние клетки или оказывать на них непосредственное действие. Это подтверждено ранее проведенной

работой нашего коллектива [14], в которой экспериментально было показано прямое связывание с мишенями только цепи *Plaur-miR1-5p*.

В настоящей работе мы оценивали влияние *Plaur-miR1-5p* на ангиогенез, используя эксплантную модель сосудистого колечка в Матригеле, и ВВ, полученные из среды культивирования МСК-ЖТ мышей дикого типа (везикулы WT) и нокаутных по гену *Plaur* (везикулы *Plaur-/-*), не экспрессирующих *Plaur-miR1-5p*. ВВ оказывали стимулирующее влияние на процессы ангиогенеза, но отличались по направленности своего действия. Так, ВВ от МСК *Plaur-/-* мышей отличались сниженной способностью стимулировать миграцию/пролиферацию эндотелиальных клеток по сравнению с ВВ от МСК WT мышей (рис. 1, 2). Однако ВВ от МСК *Plaur-/-* мышей усиливали миграцию/пролиферацию других сосудистых клеток, не экспрессирующих VE-кадгерин — основной маркер эндотелиальных клеток [28]. Известно, что в данной модели из эксплантов в Матригель помимо эндотелиальных клеток могут мигрировать гладкомышечные клетки, перициты или МСК [29]. В этой связи мы предположили, что данный эффект ВВ от МСК *Plaur-/-* мышей может быть зависим от *Plaur-miR1-5p*. Известно, что микроРНК могут интерферировать сразу с несколькими генами-мишенями, при этом как ингибируя, так и усиливая их экспрессию, что объясняет дуализм наблюдаемого действия и разные эффекты в разных типах клеток [30]. Используя алгоритм TargetScan в сочетании с последующей кластеризацией мишеней в базе STRING, мы выделили ряд генов, которые потенциально могут быть мишенями *Plaur-miR1-5p* и при этом имеют прямое влияние на ангиогенез. Среди мишеней оказались гены как стимулирующие (*Emcn*, *Prkx*, *Rhoj*, *Col4a3*, *Prokr1*), так и подавляющие ангиогенез (*Mmrn2*). Эндомуцин, кодируемый геном *Emcn*, стимулирует образование капилляроподобных структур, активируя сигнализацию VEGF/VEGFR2 [31]. Его нокаут приводит к снижению пролиферации и миграции сосудистых клеток, а также подавляет сигнализацию VEGF/VEGFR2 [32]. Протеинкиназа, сцепленная с X-хромосомой (ген *Prkx*), и Прокинетицин 2 (ген *Prkx*) обладают схожим действием, усиливая миграцию и пролиферацию ЭК [33]. Протеинкиназа, сцепленная с X-хромосомой, являясь антагонистом протеинкиназы А, активирует ц-АМФ киназу [33]. В свою очередь, прокинетицин 2 активирует сигнальный каскад PKR1/MAPK/

Акт [34]. Малая ГТФ-аза Rhoj обеспечивает адгезию сосудистых клеток в капиллярноподобных структурах за счет регуляции фибриллогенеза через  $\alpha 5\beta 1$  интегрин [35]. Еще одна потенциальная мишень *Plaur-miR1-5p* — Мулитимерин 2 (ген *Mmrn2*), который является негативным регулятором ангиогенеза. Связывая VEGFA, Мулитимерин 2 подавляет подвижность эндотелиальных клеток [36].

Можно предположить, что у мышей, нокаутных по гену *Plaur*, в отсутствие *Plaur-miR1-5p* усиливается экспрессия Мулитимерина 2, чем и может быть обусловлен эффект сниженной миграции эндотелиальных клеток в отсутствие гена *Plaur*. Предложенные механизмы влияния нокаута гена *Plaur* и связанного с ним отсутствия *Plaur-miR1-5p* на процессы ангиогенеза нуждаются в экспериментальных доказательствах, что представляет собой перспективу наших дальнейших исследований.

Суммируя полученные в настоящей работе данные о возможном участии гена *Plaur* и *Plaur-miR1-5p* в регуляции процессов ангиогенеза, мы показали, что в отсутствие гена *Plaur* наблюдается максимальная миграция и (или) пролиферация сосудистых клеток на модели сосудистого колечка в Матригеле. В основе та-

кого эффекта нокаута гена *Plaur* может лежать регуляция с участием микроРНК, считываемых с гена урокиназного рецептора. Мы обнаружили, что *Plaur-miR1-5p*, транскрибируемая с гена *Plaur*, входит в состав внеклеточных везикул, продуцируемых МСК-ЖТ. МСК регулируют процессы ангиогенеза как за счет непосредственного контакта с сосудистыми клетками, так и за счет активно продуцируемых внеклеточных везикул. Действуя сразу на несколько генов-мишеней, *Plaur-miR1-5p* в составе ВВ, полученных от МСК-ЖТ, предположительно усиливает миграцию и(или) пролиферацию неэндотелиальных клеток, но не оказывает стимулирующего действия на эндотелиальные клетки и формирование ими капиллярноподобных структур.

**Финансирование исследования:** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках научного проекта ГЗ НИР № НИОКТР 121031300184-8 «Посттрансляционные механизмы регуляции процессов роста сосудов и нервов урокиназной системой».

**Funding:** This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (state assignment SRW No. RTD 121031300184-8 “Post-translational mechanisms the growth processes of blood vessels and nerves regulation by the urokinase system”).

## Литература

1. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(8): a005090.
2. Merino-González C, Zuñiga FA, Escudero C, Ormazabal V, Reyes C, Nova-Lamperti E, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. Front Physiol. 2016;7:24.
3. Ефименко А, Джояшвили Н, Калинина Н, Кочегура Т, Акчуринов РС, Ткачук ВА и др. Изменения ангиогенных свойств ММСК жировой ткани с возрастом у больных ишемической болезнью сердца. Гены и клетки. 2012;7(4):73–82.
4. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. Circulation research. 2017;120(10):1658–1673.
5. Villarroja-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: regulation of exosome loading. Seminars in cancer biology. 2014;28:3–13.
6. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, Vesterlund M, Pham MT, Bramlett CS, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. Stem cells (Dayton, Ohio). 2016;34(3):601–613.
7. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. Stem cells and development. 2015;24(14):1635–1647.
8. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. Nature structural & molecular biology. 2012;19(6):586–593.

9. Kang T, Jones TM, Naddell C, Bacanamwo M, Calvert JW, Thompson WE, et al. Adipose-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of miRNA-31. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(4):440–450.
10. Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *Journal of cell science*. 2016;129(11):2182–2189.
11. Lombardo G, Dentelli P, Togliatto G, Rosso A, Gili M, Gallo S, et al. Activated Stat5 trafficking Via Endothelial Cell-derived Extracellular Vesicles Controls IL-3 Pro-angiogenic Paracrine Action. *Scientific reports*. 2016;6:25689.
12. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 2006;108(9):3068–3071.
13. Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(8):1562–1568.
14. Rysenkova KD, Troyanovskiy KE, Klimovich PS, Bulyakova TR, Shelomentseva EM, Shmakova AA, et al. Identification of a Novel Small RNA Encoded in the Mouse Urokinase Receptor uPAR Gene (*Plaur*) and Its Molecular Target Mef2d. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2022;15:865858.
15. Larusch GA, Merkulova A, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Sitrin RG, Cines DB, et al. Domain 2 of uPAR regulates single-chain urokinase-mediated angiogenesis through  $\beta$ 1-integrin and VEGFR2. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;305(3):H305–P320.
16. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood*. 2004;103(3):955–962.
17. Dergilev KV, Beloglazova IB, Tsokolaeva ZI, Vasilets YD, Parfenova EV. Deficiency of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Is Associated with the Development of Perivascular Fibrosis in Mouse Heart. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2022;173(1):5–9.
18. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular cell*. 2016;64(2):320–333.
19. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 2015;4.
20. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787–798.
21. Oti EU, Olusola MO, Eze FC, Enogwe SU. Comprehensive review of K-Means clustering algorithms. *criterion*. 2021;12:22–23.
22. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*. 2023;51(D1):D638–B646.
23. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Frontiers in oncology*. 2018;8:24.
24. Zhai BT, Tian H, Sun J, Zou JB, Zhang XF, Cheng JX, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a therapeutic target in cancer. *Journal of translational medicine*. 2022;20(1):135.
25. Semina E, Rubina K, Stepanova V, Tkachuk V. Involvement of the urokinase receptor and its endogenous ligands in the development of the brain and the formation of cognitive functions. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2018;48:16–27.
26. Tang Y, Zong S, Zeng H, Ruan X, Yao L, Han S, et al. MicroRNAs and angiogenesis: a new era for the management of colorectal cancer. *Cancer cell international*. 2021;21(1):221.
27. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–297.
28. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(2):223–232.

Климович П.С., Реутов А.В., Щипова А.А., Сысоева В.Ю., Арбатский М.С., Рубина К.А., Семина Е.В. Роль Plaur-miR1-5p, кодируемой геном урокиназного рецептора Plaur, в процессах ангиогенеза

29. Nicosia RF. The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(10):4113–4136.
30. Lee D, Shin C. MicroRNA-target interactions: new insights from genome-wide approaches. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1271(1):118–128.
31. Park-Windhol C, Ng YS, Yang J, Primo V, Saint-Geniez M, D’Amore PA. Endomucin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration, growth, and morphogenesis by modulating VEGFR2 signaling. *Scientific reports*. 2017;7(1):17138.
32. Zhang G, Yang X, Gao R. Research progress on the structure and function of endomucin. *Animal models and experimental medicine*. 2020;3(4):325–329.
33. Li X, Iomini C, Hyink D, Wilson PD. PRKX critically regulates endothelial cell proliferation, migration, and vascular-like structure formation. *Developmental biology*. 2011;356(2):475–485.
34. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, et al. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(3):H844–P852.
35. Sundararaman A, Fukushima Y, Norman JC, Uemura A, Mellor H. RhoJ Regulates  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Trafficking to Control Fibronectin Remodeling during Angiogenesis. *Current biology : CB*. 2020;30(11):2146–2155.e5.
36. Andreuzzi E, Colladel R, Pellicani R, Tarticchio G, Cannizzaro R, Spessotto P, et al. The angiostatic molecule Multimerin 2 is processed by MMP-9 to allow sprouting angiogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;64:40–53.

### Об авторах

**Климович Полина Сергеевна** — к.б.н., старший научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова.

**Реутов Артем Владимирович** — магистрант факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

**Щипова Анна Алексеевна** — студентка факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

**Сысоева Вероника Юрьевна** — к.б.н., ведущий научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

**Арбатский Михаил Сергеевич** — к.э.н., заведующий лабораторией, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова.

**Рубина Ксения Андреевна** — д.б.н., заведующая лабораторией морфогенеза и репарации тканей факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

**Семина Екатерина Владимировна** — д.б.н., заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта), ведущий научный сотрудник факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

### Authors

**Polina S. Klimovich** — Ph.D. in Biology, Senior researcher of Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University and of Chazov National Medical Research Centre of Cardiology.

**Artem V. Reutov** — master’s student of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Klimovich P.S., Reutov A.V., Shchipova A.A., Sysoeva V.Yu., Arbatsky M.S., Rubina K.A., Semina E.V.  
The role of Plaur-miR1-5p encoded within the urokinase receptor gene (*Plaur*) in angiogenesis

**Anna A. Shchipova** — student of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

**Veronika Yu. Sysoeva** — Ph.D. in Biology, leading researcher of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

**Mikhail S. Arbatsky** — Ph.D. in Economics, head of the laboratory of Pirogov Russian National Research Medical University.

**Kseniya A. Rubina** — D.Sci. in Biology, head of the laboratory of morphogenesis and tissue repair of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.

**Ekaterina V. Semina** — D.Sci. in Biology, deputy head for Development and Project Activities of Immanuel Kant Baltic Federal University, Leading Researcher of Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University.