

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 576.32/.36

**ИНДУКЦИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА В КЛЕТКАХ
НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВ**

© 2023 г. А. А. Корягина¹, О. А. Недогреева¹, А. А. Буянова¹, Ю. С. Спивак¹,
А. П. Большаков¹, Н. В. Гуляева¹, М. Ю. Степаничев¹ *

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 11.05.2023 г.

Принята к публикации 12.05.2023 г.

Фактор роста нервов (ФРН) является фактором, определяющим дифференцировку нейронов. ФРН играет важную роль в росте и дифференцировке сенсорных и симпатических нейронов в периферической нервной системе. В зрелом мозге ФРН участвует в поддержании холинергического фенотипа нервных клеток. В работе была исследована возможность индукции холинергического фенотипа в клетках нейробластомы мыши, которые часто используются для моделирования разных физиологических и патологических процессов, протекающих в нервной системе. Клетки нейробластомы линий NB41A3 и Neuro2a чаще всего используются, когда необходимо исследовать свойства холинергических нейронов. В клетках этих линий была обнаружена экспрессия рецепторов TrkA и p75NGFR, которая характерна для холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга. Дифференцировку клеток вызывали аппликацией ФРН или 8-Вг-цАМФ. ФРН не вызывал выраженной дифференцировки клеток по нейрональному фенотипу. Кроме того, не было обнаружено изменений содержания мРНК и белка холинацетилтрансферазы и везикулярного транспортера ацетилхолина, которые использовали в качестве маркеров холинергического фенотипа. Таким образом, клетки линий NB41A3 и Neuro2a не могут быть рекомендованы для использования в качестве модели холинергических нейронов *in vitro*, поскольку они не дифференцируются и/или не демонстрируют признаков холинергического фенотипа в ответ на стимуляцию ФРН.

Ключевые слова: фактор роста нервов, нейробластома, дифференцировка, холинацетилтрансфераза, везикулярный транспортер ацетилхолина, ацетилхолинэстераза

DOI: 10.31857/S1027813323040131, EDN: OOFTHU

ВВЕДЕНИЕ

Дифференцировка нейронов связана со множеством морфологических и биохимических изменений. Ключевым фактором роста и дифференцировки нейронов является фактор роста нервов (ФРН). В периферической нервной системе ФРН регулирует дифференцировку сенсорных и симпатических нейронов, запуская морфологические модификации и экспрессию специфических генов [1, 2]. Широко известно, что ФРН отвечает за поддержание жизнедеятельности некоторых популяций нейронов, активируя сигнальные каскады взаимодействием с TrkA и p75 рецепторами [3]. В головном мозге ФРН необходим для поддержания фенотипических характеристик холинергических нейронов. На своих терминалях холинергические нейроны экспрессируют оба рецептора ФРН – и p75/NGFR, и TrkA/NTRK1. После связывания с этими рецепторами ФРН транспор-

тируется из проекционных областей холинергических нейронов вдоль их аксонов к телам, расположенным в подкорковых ядрах, таких как медиальное септальное ядро, ядра диагональной полоски Брока, базальное ядро Мейнерта, безымянная субстанция и другим [4]. Возрастные изменения в системе ФРН могут приводить к дегенерации холинергических нейронов в упомянутых областях [4, 5]. Введение ФРН или его сверхэкспрессия в мозге экспериментальных животных обладает нейропротекторными свойствами в моделях нейродегенеративных заболеваний [6–8]. Кроме того, введение ФРН в мозг представляется перспективным терапевтическим подходом для улучшения памяти при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, например, при болезни Альцгеймера [9–11].

Первичные культуры клеток, полученные от животных разных видов, являются важным инструментом исследований, предназначенных для получения данных, которые не удастся получить *in vivo* [12]. Культуры холинергических нейронов

* Адресат для корреспонденции: 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а; e-mail: m_stepanichev@ihna.ru.

наиболее часто получают из медиального септального ядра или базального ядра Мейнерта. Во всех случаях эти культуры являются смешанными, содержат помимо нейронов глиальные клетки, а холинергические нейроны составляют только малую часть от общего числа клеток. Например, культуры, полученные из медиальной перегородки, помимо холинергических содержат ГАМКергические и глутаматергические нейроны [13–17]. Для того, чтобы повысить долю холинергических нейронов, используют длительную культивацию клеток в присутствии ФРН. Так, 10–12-дневное выращивание клеток в присутствии 100 нг/мл ФРН в бессывороточной среде позволяет повысить долю холинергических неронов до 36% за счет ре-дифференцировки ГАМКергических и глутаматергических нейронов септум [18]. Похожий эффект наблюдается после обработки культуры эмбриональных стволовых клеток ФРН [19].

В последние годы значительный прогресс был достигнут в области исследования индуцибельных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСКЧ). Использование культур ИПСКЧ существенно улучшило понимание патогенеза и механизмов, задействованных в разных заболеваниях, и позволило продвинуться на пути к персонализированной медицине. Современные подходы дают возможность дифференцировать ИПСКЧ в разные типы нейронов, включая холинергические, моноаминергические и другие. Например, принципиальная возможность коррекции ассоциированной с болезнью Альцгеймера мутации в гене, кодирующем PSEN2, с применением CRISPR/Cas9 технологии геномного редактирования была показана на холинергических клетках, полученных из ИПСКЧ [20, 21]. Однако эти методы достаточно сложны и трудозатратны.

Другим источником клеток, которые часто используются в исследованиях *in vitro*, являются клетки, полученные из опухолей. Такие клеточные линии широко применяются как модели для изучения разнообразных процессов, протекающих при канцерогенезе [22]. В то же время, благодаря своей способности дифференцироваться в различные типы клеток, раковые клетки применяются для изучения молекулярных механизмов функционирования разных тканей. Нейробластома (neuroblastoma, NB) является солидной экстракраниальной опухолью, образующейся из клеток нервного гребня, по всей вероятности предшественников симпатoadренальных клеток, дифференцирующихся в нейроны симпатических ганглиев и хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников, секретирующие катехоламины [23]. После применения дифференцирующих агентов, таких как ретиноевая кислота, циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) или нейротрофины, клетки NB могут формировать отростки разной длины. Было показано, что после дифференцировки клетки линий NB41A3, Neuro2a и гибридной линии SN56 B5 G4 проявляют некоторые

черты холинергического фенотипа [24–26]. К сожалению, клетки линии SN56, полученные путем слияния иммортализованных клеток медиальной перегородки и NB, почти недоступны на рынке. В клетках линии NB41A3 можно измерить активность холинэстеразы (ХАТ) и обнаружить мРНК и белок ХАТ после длительного пересевания или аппликации цАМФ или нейротрофического фактора мозга [24, 27, 28]. В клетках линии Neuro2a можно наблюдать эти признаки холинергического фенотипа даже без применения дифференцирующих агентов [26]. Однако, ни клетки NB41A3, ни клетки Neuro2a не способны формировать холинергические синапсы в культуре [27]. Важно отметить, что наряду с холинергическими маркерами, клетки NB продолжают экспрессировать маркеры дофаминергических нейронов [29, 30].

Принимая во внимание тот факт, что важную роль в поддержании холинергического фенотипа в мозге взрослых животных играет ФРН, мы предположили, что применение ФРН может вызвать дифференцировку клеток NB в холинергические нейроны и позволит получить стабильную культуру холинергических клеток. В этой работе мы использовали ФРН для дифференцировки клеток линий NB41A3 и Neuro2a и исследовали экспрессию мРНК ХАТ и везикулярного транспортера ацетилхолина (ВАХ) и активность ХАТ для функциональной оценки, соответственно, генов холинергического локуса и фермента. Кроме того, мы оценили экспрессию ХАТ, ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и рецепторов r75 и TrkA с использованием иммуноцитохимии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клетки нейробластомы мыши NB41A3 и Neuro2a были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, С.-Петербург, Россия). Клетки линии NB41A3 культивировали в среде F10 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% сыворотки теленка (FBS, Sigma-Aldrich, США) и смесь антибиотиков Pen Strep mixture (Gibco, США). Клетки линии Neuro2a культивировали в модифицированной среде Игла (MEM, ПанЭко, Россия), содержащей 10% FBS. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Для экспериментов клетки обрабатывали 0.05% трипсином-ЭДТА (ПанЭко, Россия) в течение 5–10 мин при 37°C. Трипсин инактивировали добавлением 10% FBS в соответствующей среде, и клетки осаждали центрифугированием. Далее, клетки ресуспендировали в культуральной среде и высевали в чашки Петри с плотностью 13×10^3 клеток/см².

Для экспериментов с дифференцировкой клеток, посеянные с плотностью 13×10^3 клеток/см² в среду, содержащую 10% FBS в чашки Петри диаметром 10 см или 6- или 24-луночные планшеты, инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 4 ч

среду замешали на новую порцию с 0.5% FBS и одним из дифференцирующих агентов ФРН или 8-Br-цАМФ (оба Sigma-Aldrich, США) или без них. Использовали ФРН человека в конечной концентрации 20 нг/мл или 8-Br-цАМФ в конечной концентрации 1 мкмоль. Реагенты растворяли в стерильной воде и добавляли 10 мкл водного раствора в культуру. Клетки инкубировали в течение 48 ч.

Морфологическая оценка дифференцировки. По окончании дифференцировки культуры исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии с использованием автоматизированного микроскопа Keyence BZ-9000 (Keyence Corporation of America, США). Фотографирование проводили с увеличением объектива $\times 20$, используя CCD камеру Keyence и программное обеспечение BZ-II Viewer (Keyence Corporation of America, США), и сохраняли изображения в виде .tiff файлов. Оценку длины отростков проводили с помощью программного пакета ImageJ/Fiji (Version 1.52p, NIH, USA). Для этого изображения переводили в 8-битный формат оттенков серого и анализировали с помощью плагина "NeuronJ", как описано в работе [31]. Подсчитывали число отростков и измеряли их длину. Подсчеты проводили в 5 оптических полях 3-х культур для каждого условия эксперимента. Использовали образцы из трех независимых серий экспериментов.

Иммуноцитохимия. Для проведения иммуноцитохимической детекции экспрессии белков клетки выращивали на 10-мм покровных стеклах, покрытых поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США), помещенных в лунки 24-луночных планшетов. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (PanReas AppliChem, ФРГ) в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером pH 7.4 (ФСБ) и хранили в 0.02% растворе NaN_3 в ФСБ при 4°C до использования. Перед окрашиванием клетки трижды промывали ФСБ и неспецифическое связывание блокировали ФСБ, содержащим 5% нормальную сыворотку козы или осла (Sigma-Aldrich, США), 0.3% тритона X-100 (Serva, ФРГ) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с одним из первичных антител, разбавленных блокирующим буфером, при 4°C в течение ночи. Список использованных антител представлен в табл. 1. На следующий день клетки промывали трижды ФСБ и инкубировали с одним из соответствующих вторичных антител (табл. 1), конъюгированных с одним из флюорофоров Alexa 488 или Alexa 546 в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания клетки заключали в среду Fluoroshield с DAPI (Sigma-Aldrich, USA) и хранили при -18°C . Препараты изучали, используя микроскоп Axioskop 2 (Carl Zeiss, ФРГ).

Полимеразная цепная реакция. После окончания дифференцировки клетки дважды промывали холодным ФСБ, снимали с чашек, осаждали, замораживали и хранили при -80°C . Общую РНК

экстрагировали с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Изолированную тотальную РНК (1 мкг) очищали от следов геномной ДНК с использованием 1 U ДНКазы I (ThermoScientific, США). Синтез кДНК проводили с 0.5 мкг РНК с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы ДНК разбавляли деионизированной водой в соотношении 1 : 9 и хранили при -20°C .

В качестве позитивного контроля использовали РНК, полученную из спинного мозга и гиппокампа самцов мышей C57Bl/6. Образцы ткани забирали после эвтаназии животных, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Общую РНК экстрагировали из образцов ткани массой ~ 70 мг после их гомогенизации в реагенте ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

Экспрессию генов *Chat*, *Vacht* и *Ache* оценивали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Для амплификации использовали 2 мкл комплементарной ДНК проводили в присутствии 5 U Taq ДНК полимеразы (Евроген, Россия), 200 мкмоль каждого dNTP и 20 пмоль каждого из двух праймеров (табл. 2). Протокол амплификации включал следующие стадии: 3 мин 95°C , 32 цикла амплификации (инкубация при 95°C , $50-66^\circ\text{C}$ и 72°C в течение 15, 15 и 30 с соответственно), 5 мин при 72°C . Температуры отжига для каждой пары праймеров указаны в табл. 2.

Образцы охлаждали и 20 мкл продукта ПЦР разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле, содержащем 0.5 мг/мл бромида этидия параллельно со стандартными фрагментами ДНК известного размера. Гели фотографировали в УФ свете.

Содержание транскриптов мРНК генов *Ntrk1* and *Ngfr* определяли с помощью ПЦР в реальном времени, используя амплификатор Bio-Rad CFX-384 (Bio-Rad, США). Реакцию проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR + Low-ROX PCR mix (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Относительное содержание мРНК нормализовали по геометрическому среднему экспрессии мРНК гена *Gapdh*. В качестве негативного контроля использовали образцы, предварительно обработанные ДНКазой I. Экспрессию генов рассчитывали по методу $E^{-\Delta\Delta Ct}$.

Амплификацию фрагмента гена *Chat* в образцах, полученных из клеток NB41A3 и Neuro2a, проводили с помощью ПЦР с вложенными праймерами, как описано в работе [28]. Контрольные образцы РНК получали из спинного мозга мыши. Сначала выполняли ПЦР с использованием пары внешних праймеров (табл. 2), затем 5 мкл реакционной смеси брали в качестве матрицы для амплификации с использованием пары внутренних праймеров. Продукты ПЦР разделяли с помощью

Таблица 1. Список антител, использованных в работе

Антиген	Тип	Кат. ##, производитель	Разведение	Условия
ChAT	Rabbit polyclonal IgG	sc-20672; Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	12–16 h +4°C
ChAT	Mouse monoclonal IgG	sc-55557; Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	12–16 h +4°C
ChAT	Rabbit monoclonal IgG	ab-178850; Abcam	1 : 200	12–16 h +4°C
ChAT	Mouse monoclonal IgG	AMAb-91129; Sigma-Aldrich	1 : 200	12–16 h +4°C
AChE	Goat polyclonal IgG	sc-6432; Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	12–16 h +4°C
VAcHt	Rabbit polyclonal IgG	NB100-91348; Novus	1 : 200	12–16 h +4°C
P75NTR	Rabbit monoclonal IgG	mAb-8238; Cell Signaling Technology	1 : 200	12–16 h +4°C
P75NGFR	Rabbit polyclonal IgG	ANT-007, Alomone Lab	1 : 200	12–16 h +4°C
TrkA	Rabbit polyclonal IgG	ANT-018, Alomone Lab	1 : 200	12–16 h +4°C
TrkA	Rabbit monoclonal IgG	mAb-2510, Cell Signaling Technology	1 : 200	12–16 h +4°C
Rabbit IgG fragment (H + L)	Goat polyclonal IgG-AlexaFluor 546 conjugate	A-11010; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C
Rabbit IgG fragment (H + L)	Goat polyclonal IgG-AlexaFluor 488 conjugate	A-11008; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C
Goat IgG (H + L)	Donkey polyclonal IgG-AlexaFluor 488 conjugate	A-11055; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C
Mouse IgG (H + L)	Goat polyclonal IgG-AlexaFluor 488 conjugate	A-11017; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C

электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 0.5 мг/мл бромида этидия и стандартных образцов ДНК с известной массой. Гели фотографировали в УФ свете.

Для рестрикционного анализа продукты ПЦР вырезали из агарозного геля и очищали с применением набора реагентов Cleanup Mini kit (Евроген, Россия). Рестрикционный анализ выполняли с помощью эндонуклеазы AfeI (NEB, США). Получившиеся продукты реакции разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле.

Для секвенирования продукты ПЦР вырезали из агарозного геля, как указано выше. Очищенные продукты субклонировали в вектор pAL2-T с использованием набора реагентов TA Cloning (Евроген, Россия) и протокола производителя. Рекombинантный вектор трансформировали в TOP10' E. coli по стандартному протоколу теплового шока. Плазмиды, содержавшие ПЦР инсерции очищали с использованием набора реагентов Plasmid Miniprep kit (Евроген, Россия). Для определения последовательностей ПЦР инсерций проводили секвенирование по Сэнгеру (Евроген, Россия). Анализ последовательностей проводили с помощью программных средств Lasergene SeqMan (DNASTAR, США) и BLAST (NCBI, США).

Определение активности ХАТ. Измерение активности ХАТ проводили с использованием набора реагентов Choline Acetyltransferase (ChAT) Activity Assay Kit (Cloud Clone Corp., КНР). Клетки собирали, гомогенизировали и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Супернатанты использовали для анализа. Реакцию проводили согласно инструкции производителя. Оптическую плотность растворов, содержавших продукты реакции, измеряли спектрофотометрически при длине волны 324 нм с помощью планшетного спектрофотометра HidexSense (Hidex, Финляндия). Активность ХАТ рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции и представляли в виде нмоль/ч/мг белка. В качестве позитивного контроля использовали гомогенаты гиппокампа и неокортекса мыши. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда.

Статистический анализ. Соответствие распределения полученных данных нормальному оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Сравнение данных проводили с использованием непараметрического теста Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по тесту Данна. Результаты представлены в виде медианы и значений верхней и нижней квартилей.

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Отжиг T , °C
Chat	CTTGAATGGAGCGAATCGTTGGTA	GAGCTTCTTGTTGCCTGTCATCA	66
Chat	Внешние праймеры		65 с постепенным снижением температуры на 0.5°C за каждый цикл до 50°C
	GGCAGCCTCTGTATGAAGC	CAGCCTTGTTGTTGCCTGTCATGG	
	Внутренние праймеры		
	ATGAACGCCTGCCTCCAATCG	GGATGAAGCCATCAGGACTGC	
Vacht	CGCGATGTGCTGCTTGATGAAC	GGGTCTGCAGCTGCGGGAGT	62
Acche	CGGCCTCCTTGGATGTGTATG A	AAGCCGTTGATCCAGCAGACCTA	66
Ntrk1	CCAGATGCCAATGACTCTG	CCCAGCACGTACATTCTTC	60
Ngfr	CGAGACCTCATAGCCAGCACAG	CACAACCACAGCAGCCAAGATG	65
Gapdh	TTCAACAGCAACTCCCACTCTT	CCCGTATTCAATTGTCATACCAG	63

Различия между группами считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки линий NB41A3 и Neuro2a экспрессируют рецепторы p75 и TrkA. Была выполнена иммунохимическая детекция присутствия рецепторов ФРН в клетках линий NB41A3 и Neuro2a. Клетки фиксировали через 48 ч после обработки ФРН и 8-Br-цАМФ. Клетки экспрессировали оба рецептора ФРН даже в отсутствие дифференцирующих агентов (рис. 1а). В обедненной среде клетки формировали отростки и та же картина сохранялась в присутствии и ФРН, и 8-Br-цАМФ. Специфичные антитела к рецепторам связывались с рецепторами как на теле клеток, так и на отростках. Окраска наблюдалась практически во всех клетках исследованных образцов культуры.

Экспрессия мРНК генов, кодирующих p75 и TrkA, наблюдалась во всех образцах клеток NB41A3 независимо от условий эксперимента (рис. 1б).

Влияние ФРН на дифференцировку клеток линий NB41A3 и Neuro2a. Применение различных дифференцирующих агентов, включая цАМФ, ретиноевую кислоту, 5-аза-2'-дезоксцитидин, нейротрофический мозговой фактор и другие, вызывает дифференцировку клеток нейробластомы в нейроно-подобные клетки. После прикрепления клеток к дну чашек клетки NB изменяют свою морфологию, формируя отростки в направлении соседних клеток. Сразу после прикрепления эти отростки короткие и становятся длиннее по мере старения культуры. Мы оценили показатели морфологической дифференцировки, такие как число отростков и их длина (рис. 2).

Доля клеток NB41A3, которые образовывали отростки, была значимо меньше после аппликации 8-Br-цАМФ (Kruskal-Wallis test $H(3, 52) = 20.47, p < 0.0001$), хотя их длина была сходна после применения обоих дифференцирующих аген-

тов ($H(3, 52) = 3.62, p > 0.16$). В культуре клеток Neuro2a доля клеток, формирующих отростки, не менялась существенно после 48 ч. инкубации в присутствии ФРН или 8-Br-цАМФ ($H(3, 65) = 5.34, p > 0.06$). В то же время длина отростков значимо возрастала в дифференцирующихся клетках Neuro2a ($H(3, 65) = 24.01, p < 0.0001$). Этот эффект был более выражен в случае инкубации с 8-Br-цАМФ ($p < 0.001$ согласно тесту Данна). Таким образом, дифференцирующий эффект ФРН не проявлялся ни в культуре NB41A3, ни в культуре Neuro2a, тогда как 8-Br-цАМФ снижал долю дифференцирующихся клеток NB41A3 и стимулировал формирование отростков в клетках Neuro2a.

Влияние ФРН на экспрессию маркеров холинэргических нейронов в клетках линий NB41A3 и Neuro2a. ХАТ – ключевой фермент, участвующий в синтезе АХ и поэтому являющийся основным маркером дифференцированных холинэргических нейронов. Мы предполагали, что аппликация ФРН в культуры клеток линий NB41A3 и Neuro2a будет способствовать экспрессии ХАТ, ВТАХ и АХЭ. Используемые антитела к ХАТ не смогли выявить присутствия этого фермента в телах недифференцированных клеток (рис. 3). Ни ФРН, ни 8-Br-цАМФ не влияли на характер окрашивания клеток (рис. 3). Также не удалось выявить окрашивания ВТАХ. Клетки обеих линий окрашивались антителами к АХЭ, указывая на вероятную экспрессию этого фермента. Таким образом, нам не удалось выявить присутствия значимых количеств ХАТ и ВТАХ в исследованных культурах клеток после действия ФРН.

Для детекции экспрессии мРНК ХАТ, ВТАХ и АХЭ был использован метод ПЦР с последующим разделением продуктов реакции в агарозном геле. Как и ожидалось, в экстрактах клеток NB41A3 обнаружили присутствие транскриптов гена *Ache*, которое наблюдалось в виде полосы, соответствующей полосе, полученной для экстрактов мозга мыши. В то же время, использование стандартного протокола ПЦР не позволило выявить транскриптов генов *Chat* или *Vacht* (рис. 4а). Кроме то-

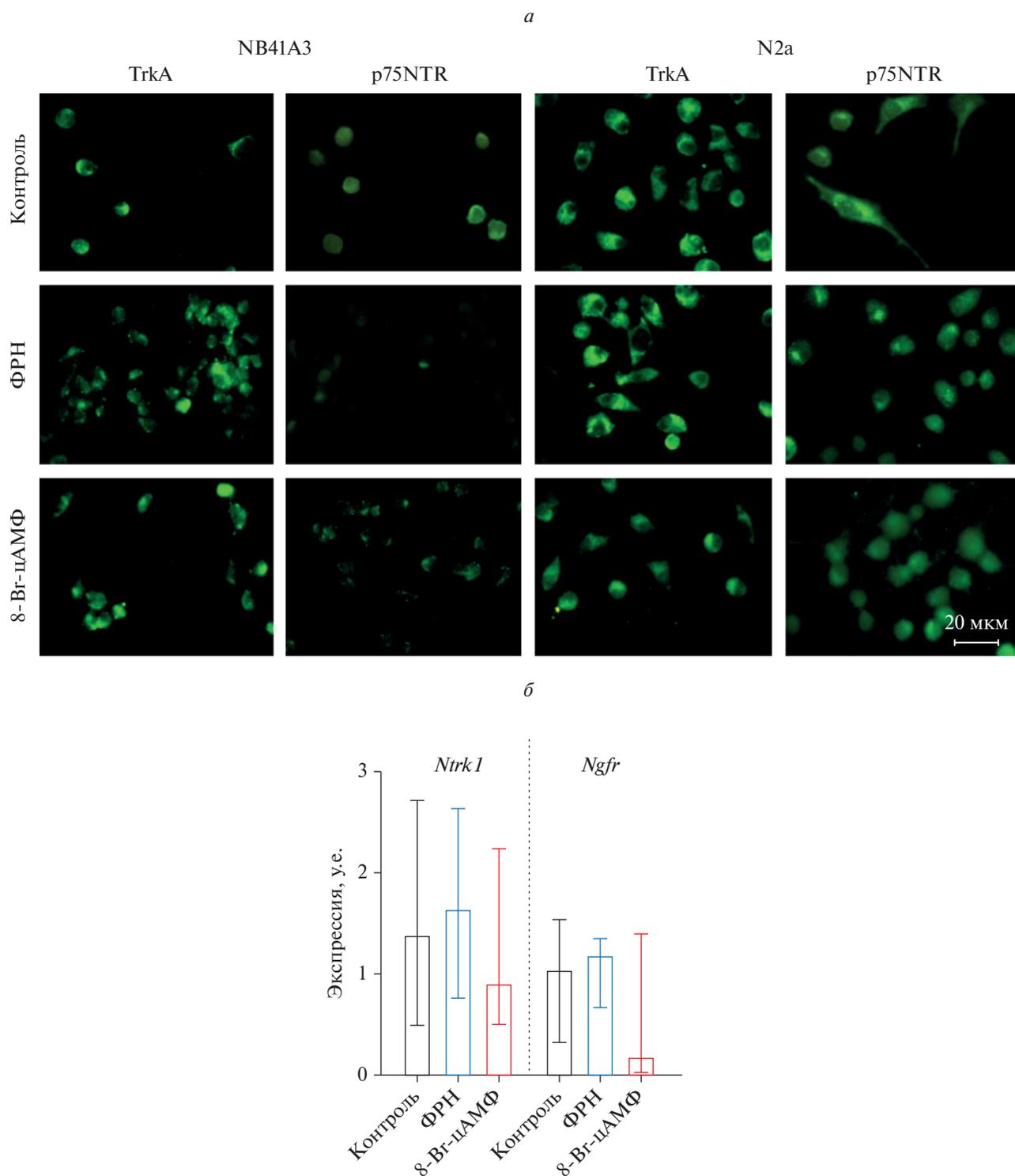


Рис. 1. Экспрессия рецепторов TrkA и p75NTR в клетках NB41A3 и Neuro2a (N2a). Клетки фиксировали через 48 ч после инкубации с растворителем (Vehicle) или одним из дифференцирующих реагентов ФРН или 8-Br-цАМФ. (а) Микрофотографии культур клеток; (б) экспрессия мРНК генов *Ntrk1* и *Ngfr*, кодирующих рецепторы TrkA и p75NTR.

го, ни ФРН, ни 8-Br-цАМФ не влияли на экспрессию мРНК этих генов в культуре клеток.

Двухстадийная ПЦР со вложенными праймерами была дополнительно использована для об-

наружения мРНК *Chat* в клетках линий NB41A3 и Neuro2a, как это описано ранее [28]. Используя этот подход, мы обнаружили полосы, которые демонстрировали сходную, хотя и меньшую массу

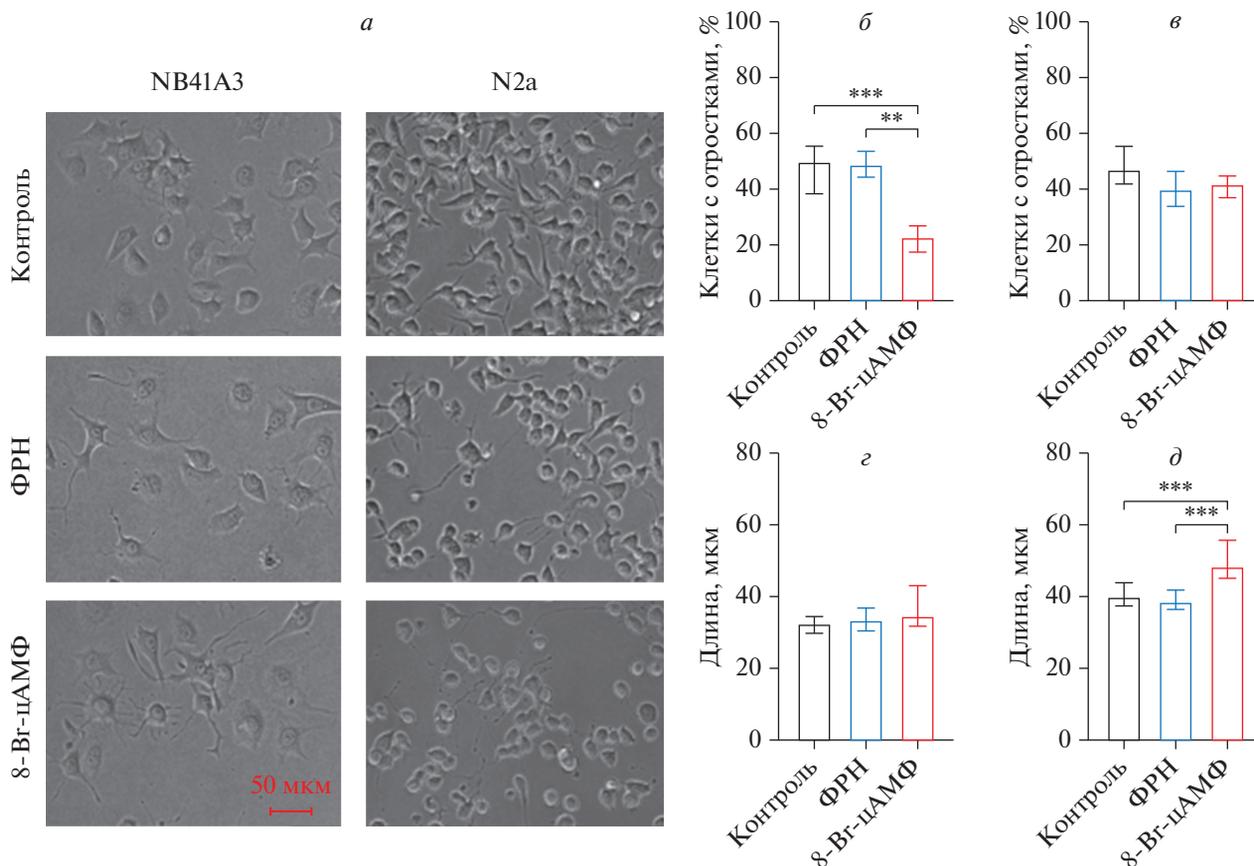


Рис. 2. Влияние ФРН и 8-Br-цАМФ на дифференцировку клеток NB41A3 и Neuro2a (N2a). (a) Микрофотографии культур клеток через 48 ч после инкубации с растворителем (Vehicle) или одним из дифференцирующих реагентов ФРН или 8-Br-цАМФ; (б и в), число клеток с отростками (в % от общего числа клеток в поле зрения); (г и д), длина отростков (мкм); (б и г), клетки линии NB41A3; (в и д), клетки линии Neuro2a (N2a). Данные представлены в виде медиан и размаха между верхним и нижним квартилями. Различия статистически значимы при ** – $p < 0.01$ и *** – $p < 0.001$, согласно критерию Данна для множественных сравнений.

по сравнению с массой транскриптов из спинного мозга или неокортекса мыши (рис. 4б). Чтобы проверить возможное соответствие транскриптов, полученных из клеток, транскриптам из мозга мыши, был проведен рестрикционный анализ с помощью эндонуклеазы AfeI. Продукты ПЦР, полученные из структур головного мозга, расщеплялись нуклеазой AfeI, в то время как продукты из клеточных культур ею не расщеплялись. Таким образом, можно предположить, что продукты ПЦР из клеточных культур не соответствовали последовательности гена *Chat*. Наконец, был проведен анализ последовательностей продуктов ПЦР со вложенными праймерами. Было обнаружено, что последовательности продуктов ПЦР из клеток NB41A3 и Neuro2a не соответствовали последовательности гена *Chat*, и никаких комплементарных последовательностей выявлено не было. Эти данные дополнительно подтвердили наш предыдущий вывод о том, что в образцах клеток NB41A3 и Neuro2a отсутствовала мРНК *Chat*, и она не появлялась после воздействия ФРН или 8-Br-цАМФ.

Далее была измерена активность ХАТ в клетках NB41A3 и Neuro2a. Специфическая активность фермента варьировала от почти недетектируемого до очень низкого уровня. Так, в культуре NB41A3 активность ХАТ составляла 0–6.3 нмоль/ч/мг белка, а в культуре Neuro2a практически не детектировалась ни в одном из исследованных образцов. В гиппокампе и неокортексе мыши активность ХАТ, измеренная тем же методом, составила 0.90 и 0.47 нмоль/ч/мг белка, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клетки нейробластомы проявляют широкий спектр нейрохимических, электрофизиологических и морфологических свойств в культуре. В настоящем исследовании мы попытались применить ФРН в качестве инструмента для индукции холиннергического фенотипа в двух клеточных линиях нейробластомы NB41A3 и Neuro2a из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Используя

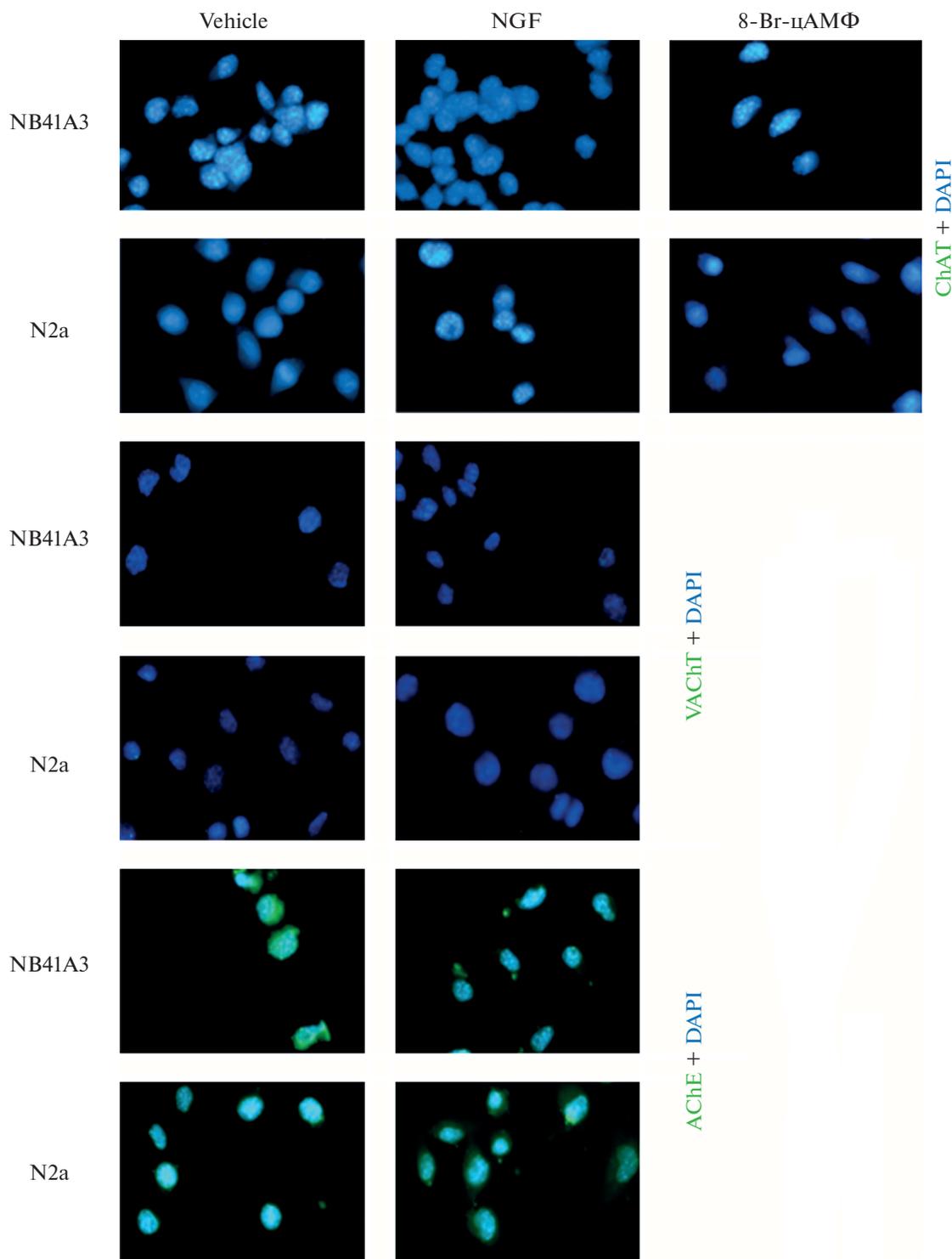


Рис. 3. Экспрессия холинергических маркеров в клетках NB41A3 и Neuro2a (N2a) в контроле и после действия дифференцирующих реагентов ФРН или 8-Br-цАМФ. Белки ХАТ, VТАХ, АХЭ выявляли с помощью специфических антител (см. Материалы и методы) с последующей детекцией связывания вторичными антителами, конъюгированными с Alexa488 (зеленый) и окраской ядер красителем DAPI.

иммуоцитохимию, были подтверждены данные предыдущих исследований о том, что клетки обеих линий экспрессировали мембранные рецепторы для ФРН, в частности TgkA и p75. Мы ожида-

ли, что применение ФРН активирует внутриклеточные каскады, способствующие экспрессии генов, ответственных за поддержание холинергического фенотипа. Однако не было выявлено ка-

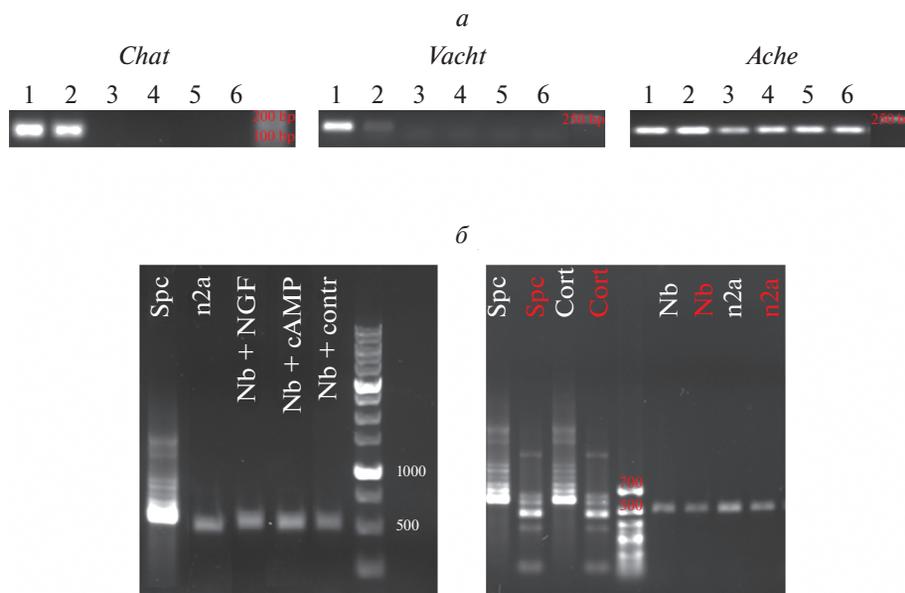


Рис. 4. Экспрессия холинергических генов в клетках NB41A3 и Neuro2a (N2a) после 48 ч инкубации с ФРН или 8-Br-цАМФ. (а) Экспрессия генов в клетках NB41A3. Дорожки: (1) гиппокамп; (2) спинной мозг; (3) NB41A3 контроль; (4) NB41A3+8-Br-цАМФ, (5) NB41A3+ФРН; (6) NB41A3+растворитель; (б) экспрессия гена *Chat* в клетках NB41A3 и N2a. Слева — анализ продуктов ПЦР с вложенными праймерами; справа — результаты рестрикционного анализа с использованием AfeI.

кой-либо значимой экспрессии белка или мРНК ХАТ в контрольных клетках или клетках, обработанных ФРН. Несмотря на то, что некоторые мРНК-подобные продукты *Chat* были обнаружены с помощью двухэтапной ПЦР со вложенными праймерами, дополнительный рестрикционный анализ этих продуктов ПЦР и их секвенирование не выявили никакого сходства между транскриптами и последовательностью гена *Chat*. Интересно, что ФРН не влиял на дифференцировку клеток NB41A3 и Neuro2a в течение 48-часовой инкубации.

Клетки нейробластомы до некоторой степени напоминают клетки-предшественники нейронов [22, 23, 32]. Добавление ряда веществ может индуцировать дифференцировку этих клеток как морфологически путем индукции роста нейритов, так и химически путем активации экспрессии нейрон-специфичных генов. В представленной работе были исследованы эффекты 8-Br-цАМФ и ФРН в клетках NB41A3 и Neuro2a. Хорошо известно, что цАМФ является естественным активатором протеинкиназы А (РКА), а активация сигнального каскада цАМФ/РКА ингибирует пролиферацию клеток и индуцирует дифференцировку клеток с удлинением отростков [33, 34]. Эти эффекты цАМФ были четко подтверждены в настоящем исследовании с использованием клеток Neuro2a, но не NB41A3. ФРН также имеет решающее значение для дифференцировки и выживания определенных популяций нейронов. Эффект ФРН опосредуется активацией рецепторов TrkA, ассоциированных с активируемыми

митогенами протеинкиназами (МАРК) и каскадами Ras (Ras/Raf/МЕК/ЕРК). Взаимодействие ФРН с рецепторами TrkA в опухолевых клетках приводит к ингибированию их пролиферации и индукции их дифференцировки с образованием отростков [35–37]. Этот механизм требует участия цАМФ-активируемой киназы и Ca²⁺-кальмодулин-зависимой протеинкиназы. В настоящем исследовании не было выявлено дифференцирующего эффекта ФРН в клетках NB41A3 или Neuro2a. Таким образом, в отличие от предыдущего исследования [28], 48-инкубация клеток NB41A3 с цАМФ или ФРН была недостаточной для индукции дифференцировки. Кроме того, в клетках Neuro2a влияние ФРН на морфологические показатели дифференцировки было менее выраженным по сравнению с цАМФ.

Экспрессия холинергического фенотипа критически зависит от присутствия как TrkA, так и p75 рецепторов. В головном мозге холинергические нейроны базальных ядер переднего мозга составляют одну из немногих популяций нейронов, в которых экспрессия p75 сохраняется на протяжении всей жизни. Более того, среди нейронов базальных ядер переднего мозга только холинергические нейроны экспрессируют рецептор p75 [38]. Sobreviela и соавт. [39] показали, что практически все нейроны стриатума совместно экспрессируют TrkA и ХАТ, но не рецептор p75. В пределах комплекса септум-диагональная поллюка практически все нейроны, содержащие ХАТ, при этом экспрессируют как TrkA, так и p75 рецепторы. В базальном ядре были обнаруже-

ны многочисленные нейроны, экспрессирующие TrkA/ХАТ и TrkA/p75. Однако некоторые другие группы нейронов могут экспрессировать рецепторы TrkA в других областях мозга. Ген *Chat* содержит цАМФ- и ФРН-чувствительные элементы, указывающие на участие обоих веществ в регуляции экспрессии ХАТ [40]. Имеется несколько работ, демонстрирующих экспрессию ХАТ в клетках нейробластомы [24–28]. В настоящем исследовании мы не смогли иммуноцитохимически обнаружить белок ХАТ, несмотря на применение нескольких антител от разных производителей, которые эффективно выявляли ХАТ в срезах головного мозга. Также не удалось измерить какую-либо значимую ферментативную активность ХАТ. Более того, хотя двухэтапный ПЦР-анализ со вложенными праймерами выявил транскрипты с массой, аналогичной таковой в образцах головного мозга, последующее секвенирование продуктов ПЦР не обнаружило какого-либо соответствия последовательности мРНК нейробластомы ожидаемой последовательности мРНК *Chat* из головного мозга. Это дополнительно подтверждает тот факт, что клетки NB41A3 и Neuro2a не экспрессировали ХАТ, основной фермент, ответственный за синтез АХ в холинергических нейронах. Важно, что в настоящем исследовании была проведена детальная идентификация продуктов ПЦР, которая отсутствовала в предыдущих исследованиях. Например, мы применили праймеры, описанные в работе [28], для ПЦР со вложенными праймерами; однако авторы этой работы не исследовали последовательности конечных продуктов реакции.

Безусловно, нельзя исключить вероятность того, что отсутствие экспрессии ХАТ в клетках NB может быть связано с недостаточным ингибированием пролиферации клеток или слабым дифференцирующим эффектом использованных веществ. Например, Rosenberg et al. [24] отмечали, что специфическая активность ХАТ наблюдалась только в условиях, когда пролиферация клеток NB41A3 была полностью подавлена. Остановка пролиферации важна также и для появления других холинергических маркеров, таких как активность АХЭ [41] или экспрессия рецепторов АХ [42]. Однако, нам удалось иммуноцитохимически выявить экспрессию белка АХЭ даже в недифференцированных клетках обеих исследованных линий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные модели часто используются в различных областях нейробиологии, включая исследования пролиферации, развития и дифференцировки клеток, токсикологические исследования, нейродегенерации и другие. Клетки нейробластомы часто используются в качестве модельной системы, которая позволяет получать нейроноподобные клетки различных фенотипов. Линии

NB41A3 и Neuro2a были использованы в серии исследований в качестве модели холинергических нейронов. Однако в настоящем исследовании было продемонстрировано, что эти клетки могут лишь частично демонстрировать признаки холинергических клеток. Кроме того, применение важного фактора дифференцировки и поддержания холинергического фенотипа *in vivo* ФРН оказалось недостаточным для индукции этого фенотипа в клетках нейробластомы. Таким образом, необходимо более широкое и тщательное исследование клеток, полученных из опухолей, перед тем как рекомендовать культуры нейробластомы для изучения специфических фенотипов нейронов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20–015–00226).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meakin S.O., Shooter E.M. // Trends Neurosci. 1992. V. 15. P. 323–331.
2. Sofroniew M.V., Howe C.L., Mobley W.C. // Annu. Rev. Neurosci. 2001. V. 24. P. 1217–1281.
3. Chao M.V. // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. P. 299–309.
4. Niewiadomska G., Mietelska-Porowska A., Mazurkiewicz M. // Behav. Brain Res. 2011. V. 221. P. 515–526.
5. Schliebs R., Arendt T. // Behav. Brain Res. 2011. V. 221. P. 555–563.
6. Tuszyński M.H. // Cell Transplant. 2000. V. 9. P. 629–636.
7. Dobryakova Y.V., Spivak Y.S., Zaichenko M.I., Koryagina A.A., Markevich V.A., Stepanichev M.Y., Bolshakov A.P. // Front. Neurosci. 2021. V. 15. P. 745050.
8. Dobryakova Y.V., Zaichenko M.I., Spivak Y.S., Stepanichev M.Y., Markevich V.A., Bolshakov A.P. // Neurochem. J. 2021. V. 15. P. 273–281.
9. Stepanichev M.Y. // Neurochem. J. 2011. V. 5. P. 159–168.
10. Tuszyński M.H., Yang J.H., Barb D., U H.S., Bakay R.A., Pay M.M., Masliah E., Conner J.M., Kobalka P., Roy S., Nagahara A.H. // JAMA Neurol. 2015. V. 72. P. 1139–1147.
11. Tuszyński M.H., Thal L., Pay M., Salmon D.P., U H.S., Bakay R., Patel P., Blesch A., Vahlsing H.L., Ho G., Tong G., Potkin S.G., Fallon J., Hansen L., Mufson E.J., Kordower J.H., Gall C., Conner J. // Nat. Med. 2005. V. 11. P. 551–555.
12. Ferro M., Doyle A. // Cell Biol. Toxicol. 2001. V. 17. P. 205–212.
13. Colom L.V., Castaneda M.T., Reyna T., Hernandez S., Garrido-Sanabria E. // Synapse. 2005. V. 58. P. 151–164.

14. Colom L.V., Castaneda M.T., Aleman D., Touhami A. // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 541. P. 54–57.
15. Huh C.Y.L., Danik M., Manseau F., Trudeau L.E., Williams S. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 1404–1409.
16. Teles-Grilo Ruivo L.M., Mellor J.R. // *Front. Synaptic Neurosci.* 2013. V. 5. P. 2.
17. Mangoura D., Vernadakis A. // *Dev. Brain Res.* 1988. V. 40. P. 25–35.
18. Latina V., Caioli S., Zona C., Ciotti M.T., Amadoro G., Calissano P. // *Front. Cell Neurosci.* 2017. V. 11. P. 68.
19. Antonov S.A., Manuilova E.S., Dolotov O.V., Kobylansky A.G., Safina D.R., Grivennikov I.A. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. P. 679–683.
20. Ortiz-Virumbrales M., Moreno C.L., Kruglikov I., Marazuela P., Sproul A., Jacob S., Zimmer M., Paull D., Zhang B., Schadt E.E., Ehrlich M.E., Tanzi R.E., Arancio O., Noggle S., Gandy S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2017. V. 5. P. 77.
21. Moreno C.L., Guardia L., Della Shnyder V., Ortiz-Virumbrales M., Kruglikov I., Zhang B., Schadt E.E., Tanzi R.E., Noggle S., Buettner C., Gandy S. // *Mol. Neurodegener.* 2018. V. 13. P. 33.
22. Campos Cogo S., Gradowski Farias da Costa do Nascimento T., de Almeida Brehm Pinhatti F., de França Junio N., Santos Rodrigues B., Cavalli L.R., Elifio-Esposito S. // *Exp. Biol. Med.* 2020. V. 245. P. 1637–1647.
23. Johnsen J.I., Dyberg C., Wickström M. // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. V. 12. P. 9.
24. Rosenberg R.N., Vandeventer L., De Francesco L., Friedkin M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971. V. 68. P. 1436–1440.
25. Blusztajn J.K., Venturini A., Jackson D.A., Lee H.J., Wainer B.H. // *J. Neurosci.* 1992. V. 12. P. 793–799.
26. Kumar M., Katyal A. // *Data Br.* 2018. V. 21. P. 2435–2440.
27. Thompson J., London E., Johnson Jr.J. // *Neuroscience.* 1982. V. 7. P. 1807–1815.
28. Thompson G., Lewis J., Mawdsley D. // 2012. <https://www.dst.defence.gov.au/publication/characterisation-cell-culture-system-investigating-nerve-agent-neurotoxicology-part-i>
29. Monsma F.J., Brassard D.L., Sibley D.R. // *Brain Res.* 1989. V. 492. P. 314–324.
30. Dziejzicka-Wasylewska M., Solich J. // *Mol. Brain Res.* 2004. V. 128. P. 75–82.
31. Pemberton K., Mersman B., Xu F. // *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* 2018. V. 16. P. A186–194.
32. Zeineldin M., Patel A.G., Dyer M.A. // *Neuron.* 2022. V. 110. P. 2916–2928.
33. Chen T., Hinton D., Zidovetzki R., Hofman F. // *Lab. Invest.* 1998. V. 78. P. 165–174.
34. Sánchez S., Jiménez C., Carrera A.C., Diaz-Nido J., Avila J., Wandosell F. // *Neurochem. Int.* 2004. V. 44. P. 231–242.
35. Aloe L., Rocco M.L., Balzamino B.O., Micera A. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016. V. 35. P. 1–7.
36. Martorana F., Gaglio D., Bianco M.R., Aprea F., Virtuoso A., Bonanomi M., Alberghina L., Papa M., Colangelo A.M. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. P. 391.
37. Reichardt L.F. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006. V. 361. P. 1545–1564.
38. Yeo T.T., Chua-Couzens J., Butcher L.L., Bredesen D.E., Cooper J.D., Valletta J.S., Mobley W.C., Longo F.M. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. P. 7594–7605.
39. Sobrieviela T., Clary D.O., Reichardt L.F., Brandabur M.M., Kordower J.H., Mufson E.J. // *J. Comp. Neurol.* 1994. V. 350. P. 587–611.
40. Wu D., Hersh L.B. // *J. Neurochem.* 1994. V. 62. P. 1653–1663.
41. Blume A., Gilbert F., Wilson S., Farber J., Rosenberg R., Nirenberg M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 67. P. 786–792.
42. Harris A.J., Dennis M.J. // *Science.* 1970. V. 167. P. 1253–1255.

Induction of Cholinergic Phenotype in Mouse Neuroblastoma Cells Using Nerve Growth Factor

A. A. Koryagina^a, O. A. Nedogreeva^a, A. A. Buyanova^a, Yu. S. Spivak^a,
A. P. Bolshakov^a, N. V. Gulyaeva^a, and M. Yu. Stepanichev^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Nerve growth factor (NGF) is a key factor of neuronal differentiation. NGF plays an important role in growth and differentiation of sensory and sympathetic neurons in the peripheral nervous system. In the mature brain, NGF is important for the maintenance of a cholinergic neuronal phenotype. Here, we studied whether NGF is sufficient to induce cholinergic phenotype in murine neuroblastoma cells, which are often used to model various physiological and pathological conditions. We detected expression of both TrkA and p75NGFR of NGF receptors in NB41A3 and Neuro2a neuroblastoma cells, two the most popular cell lines widely used to study the properties of cholinergic neurons in vitro. Treatment of both types of cell cultures with NGF did not induce in contrast to 8-Br-cAMP, which induced differentiation of Neuro2a cells with formation neuron-like morphology. Furthermore, we did not reveal the markers of cholinergic phenotype, such as ChAT or VACHT mRNA or protein in these cells, after NGF treatment. Thus, NB41A3 and Neuro2a cells cannot be used as an in vitro model of cholinergic cells because they do not differentiate and/or exhibit cholinergic phenotype in response to NGF stimulation.

Keywords: nerve growth factor, neuroblastoma cells, differentiation, choline acetyltransferase, vesicular acetylcholine transporter, acetylcholinesterase