

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.04

## АДГЕЗИЯ ТИМОЦИТОВ К ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ ТИМУСА И УЧАСТИЕ В НЕЙ НЕЙРОПИЛИНА-1 И ПЛЕКСИНА А1

© К. В. Рутто,<sup>1,\*</sup> И. В. Кудрявцев,<sup>1</sup> Е. П. Киселева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376, и

<sup>2</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, 191015;

\* электронный адрес: [krispins-90@mail.ru](mailto:krispins-90@mail.ru)

Клетки эпителия тимуса не только играют важную структурную роль, но также создают микроокружение, необходимое для созревания и дифференцировки тимоцитов. Одним из этапов созревания тимоцитов является их адгезия к эпителиальным клеткам тимуса, механизм которой изучен недостаточно. Цель исследования заключалась в изучении взаимодействия тимоцитов мыши с клеточными линиями кортикального сТЕС1-2 и медуллярного мТЕС3-10 эпителия тимуса, а именно динамики процессов адгезии, апоптоза, популяционного состава, а также экспрессии рецепторов нейропилина-1 (Nrp-1) и плексины А1 (PlexA1) среди адгезированных, неадгезированных и контрольных клеток, культивируемых без эпителия. Максимальный индекс адгезии наблюдали при 30-минутном совместном культивировании, после чего этот показатель снижался. Основной популяцией адгезированных клеток являлись незрелые лимфоциты CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, а относительное содержание зрелых тимоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> было ниже, чем в контроле. Впервые показано, что уже при коротких сроках сокультивирования (30 и 120 мин) среди популяции адгезированных клеток наблюдается увеличение (по отношению к контролю) содержания тимоцитов, находящихся в ранней фазе апоптоза. Впервые получены данные об участии Nrp-1 и PlexA1 в процессе адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса мыши в качестве самостоятельных молекул в отсутствие их лиганда семафорина 3А. Показано, что экспрессия Nrp-1 на поверхности адгезированных тимоцитов значительно снижается в процессе адгезии по сравнению с контролем, а экспрессия PlexA1 повышается. Преинкубация тимоцитов с антителами к Nrp-1 повышала их адгезию к клеткам эпителия. Полученные данные способствуют лучшему пониманию межклеточных взаимоотношений в вилочковой железе.

Ключевые слова: эпителиальные клетки, сТЕС1-2, мТЕС3-10, тимоциты, адгезия, апоптоз, Nrp-1, PlexA1.

Клетки эпителия тимуса не только играют важную структурную роль как наиболее многочисленный компонент стромы, но и создают микроокружение, необходимое для созревания тимоцитов, синтезируя для этого целый ряд ростовых факторов, хемокинов, белков внеклеточного матрикса и тимусных гормонов (Klein et al., 2014). Различают кортикальные и медуллярные клетки эпителия тимуса, которые имеют общее происхождение, но разные фенотип и функции. Кортикальные клетки эпителия тимуса осуществляют позитивную селекцию тимоцитов, а медуллярные вместе с дендритными клетками и В-лимфоцитами мозгового слоя контролируют негативную селекцию и дифференцировку Т-регуляторных клеток. В процессе дифференцировки тимоциты активно мигрируют внутри тимуса и последовательно осуществляют кратковременные контакты с разными антигенпрезентирующими клетками (Klein, 2009). Переходя от одной эпителиальной клетки к другой, тимоциты многократно проходят смену адгезии с последующей деадгезией (потерей контакта), механизмы которых недостаточно изучены.

Известно, что этап прикрепления тимоцитов к клеткам эпителия тимуса связан с наличием на тимоцитах ад-

гезионных молекул, принадлежащих к семействам иммуноглобулинов — LFA-2 (CD2) (Singer, 1990) и Thy-1 (CD90) (He et al., 1991) и интегринов — VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ , CD49d/CD29) и LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ , CD11a/18) (Yarilin et al., 1999). Кроме того, в этом процессе принимают участие белки внеклеточного матрикса и рецепторы к ним, а именно VLA-5 и упомянутый выше VLA-4 (для взаимодействия с фибронектином), а также VLA3 и VLA-6 (для взаимодействия с ламинином) (Savino et al., 2002).

Роль плексинов и нейропилина, которые теперь известны как рецепторы семафоринов (Chaudhary et al., 2014), в адгезии тимоцитов мало изучена. Участие нейропилина-1 (Nrp-1) в адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса рассматривалось только в качестве медиатора действия нейронального фактора семафорина 3А (Lepelletier et al., 2007); роль Nrp-1 и плексинов как самостоятельных молекул в этом межклеточном контакте не изучалась.

Цель настоящей работы заключалась в изучении взаимодействия тимоцитов мыши с клеточными линиями тимусного эпителия кортикального и медуллярного происхождения. В задачи входило изучение динамики процессов адгезии, развития апоптоза, популяционного состава адгезированных и неадгезированных клеток, а так-

же исследование роли в процессе адгезии таких молекул, как Nrp-1 и плексин A1 (PlexA1).

Мы показали, что максимальный индекс адгезии (35 %) наблюдался при 30-минутном совместном культивировании тимоцитов и эпителиальных клеток, после чего этот показатель снижался; основной популяцией адгезированных клеток являлись незрелые лимфоциты CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. При контакте с эпителиальными клетками происходило развитие апоптоза тимоцитов, которое было более выражено при культивировании с клетками mTEC3-10, чем с tTEC1-2; в то же время существенной разницы по другим показателям — динамике адгезии и популяционному составу адгезированных тимоцитов при взаимодействии с клетками разных линий — не получено. Мы впервые показали, что уже при коротких сроках сокультивирования (30 и 120 мин) среди популяции адгезированных клеток наблюдается увеличение содержания тимоцитов, находящихся в ранней фазе апоптоза. Впервые получены данные об участии Nrp-1 и PlexA1 в процессе адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса мыши в качестве самостоятельных молекул, в отсутствие их лиганда семафорина 3A. Полученные нами данные способствуют лучшему пониманию взаимодействия между тимоцитами и эпителиальным компартментом, что имеет важное значение для функционирования вилочковой железы.

### Материал и методика

Клеточные культуры. Работу проводили на двух линиях тимусного эпителия мышей tTEC1-2 (кортикального) и mTEC3-10 (медуллярного), любезно предоставленных проф. М. Kasai из Токийского университета. Первоначально клеточные линии были получены из тимусов новорожденных мышей линии C57BL/6 и охарактеризованы по экспрессии цитокератинов с помощью иммуногистохимического метода (Kasai et al., 1996). Клетки культивировали в среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Великобритания), 0.1 мг/мл гентамицина (Биолот, Россия) и 0.6 мг/мл глутамина (Биолот, Россия), при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °C.

Клетки. Тимоциты получали от мышей-гибридов F1 (CBA × C57BL/6) массой 16—18 г, которых умерщвляли путем цервикальной дислокации. Суспензию тимоцитов получали путем раздавливания тимуса и последующего фильтрования через нейлоновый фильтр.

Адгезия тимоцитов к клеткам эпителия. Эпителиальные клетки культивировали в 24-луночном планшете в объеме 500 мкл в концентрации  $4 \cdot 10^5$  кл/мл в среде, содержащей 10 % фетальной сыворотки, в течение 1 сут до образования конфлюэнтного монослоя. После этого среду удаляли и в каждую лунку добавляли по 250 мкл тимоцитов в концентрации  $5 \cdot 10^6$  кл/мл в среде, содержащей 1 % фетальной сыворотки, и культивировали в течение 30 или 120 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Кроме этого, при тех же условиях культивировали тимоциты без эпителия, которые использовали в качестве контроля. По окончании совместного культивирования тимоцитов и клеток эпителия монослой 2 раза осторожно отмывали от неприкрепившихся тимоцитов с помощью раствора DPBS (Биолот, Россия), содержащего 0.5 % бычьего сывороточного альбумина (Биолот, Россия). Отмытые тимоциты собирали и считали неадгезированными клетками.

Адгезированные клетки отделяли от дна планшета с помощью 200 мкл аккутазы (Sigma, США) и встряхивания на шейкере в режиме 500 об/мин при 37 °C в течение 10 мин. Тимоциты и эпителиальные клетки, значительно различающиеся по размеру и морфологии, анализировали под световым микроскопом и считали в камере Горяева. Концентрация эпителиальных клеток была постоянной в пределах одного эксперимента. Индекс адгезии (ИА) определяли по отношению числа адгезированных тимоцитов к числу внесенных и выражали в %.

Для изучения роли рецепторов клеток эпителия или тимоцитов их предварительно культивировали в среде, содержащей 1%-ную фетальную сыворотку, в течение 20 мин с поликлональными козьими антителами к Nrp-1 мыши (AF566; R&D Systems, США) в концентрации 1 мкг/мл, после чего клетки отмывали и изучали их способность к адгезии.

Проточная цитофлуориметрия. Популяционный состав тимоцитов (адгезированных, неадгезированных и контрольных, культивированных без эпителия) определяли с использованием моноклональных антител против CD4 мыши, меченных фикоэритрином (PE) (BD Pharmingen, США), и CD8, меченных PE-Cy7 (BD Pharmingen, США). Экспрессию Nrp-1 и PlexA1 на поверхности тимоцитов выявляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с помощью козьих антител против Nrp-1 мыши, меченных карбоксифлуоресцеином (R&D Systems, США), а также моноклональных крысиных антител против PlexA1 мыши, меченных аллофикоцианином (R&D Systems, США), и соответствующих изотипических контролей.

Оценка апоптоза тимоцитов. Тимоциты окрашивали ДНК-связывающими красителями YO-PRO™-1 (Invitrogen, США) в концентрации 250 нМ и 4',6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI; Biolegend Inc., США) в концентрации 1 мкг/мл при комнатной температуре в течение 10 мин (Надеев и др., 2015). С помощью YO-PRO-1 выявляли ранние стадии апоптоза, а с помощью DAPI — мертвые клетки. В каждом образце анализировали три группы клеток — живые (неокрашенные), в ранней фазе апоптоза (окрашенные YO-PRO-1), в состоянии некроза и (или) на поздних фазах апоптоза (окрашенные DAPI и YO-PRO-1) (Stemberger et al., 2010).

Для каждого из образцов было проанализировано не менее 25 000 одиночных клеток на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Удаление слипшихся клеток из зоны анализа производили на основании оценки соотношения пикового и интегрального сигналов по параметрам прямого и бокового светорассеяния для каждой из проанализированных клеток. Обработку данных проводили при помощи программы Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка. Данные обрабатывали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Динамика прикрепления и апоптоз тимоцитов в процессе адгезии к эпителиальным клеткам тимуса. Зависимость индекса адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса от времени культивирования анализировали в течение 10—240 мин. Максимальный показатель адгезии на обеих линиях эпителия тимуса составлял около 35 % через 30 мин совместного культи-

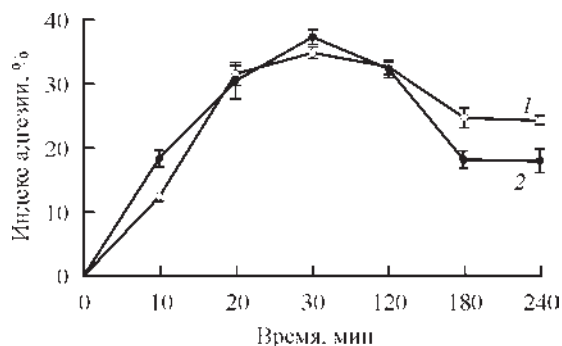


Рис. 1. Зависимость адгезии тимоцитов к клеткам сТЕС1-2 (кривая 1) и тТЕС3-10 (кривая 2) от времени инкубации.

Индекс адгезии определяли как отношение адгезированных тимоцитов к числу внесенных. Приведены средние значения и их ошибки ( $n = 4-8$ ).

вирования (рис. 1). При увеличении времени культивирования индекс адгезии постепенно уменьшался. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, также указывающих на то, что максимальный индекс адгезии (35—40 %) наблюдается на сроке 30 мин совместного культивирования тимоцитов с разными клеточными линиями тимусного эпителия (He et al., 1991; Vucevic et al., 2002). Авторы рассматривают этот срок как раннюю фазу адгезии, в которой участвуют такие адгезионные молекулы, как LFA-1, LFA-2, Thy-1 и др. (He et al., 1991; Colic et al., 1994).

На рис. 2 показаны результаты оценки апоптоза тимоцитов, культивируемых с кортикальными сТЕС1-2 (рис. 2, а, д) и медуллярными тТЕС3-10 (рис. 2, б, е) эпителиальными клетками, на двух сроках культивирования (30 и 120 мин). Среди адгезированных тимоцитов относительное содержание клеток, находящихся в фазе раннего апоптоза, было значительно выше, чем в контроле на обоих сроках. Кроме того, при сравнении двух линий эпителия оказалось, что среди адгезированных тимоцитов показатель относительного содержания раннего апоптоза при культивировании с клетками тТЕС3-10 был в 3—4 раза выше, чем с клетками сТЕС1-2.

Данные об увеличении апоптоза среди адгезированных тимоцитов по сравнению с контролем на таких ранних сроках культивирования (30 и 120 мин) получены нами впервые. Этот вопрос подробно исследовали в 90-х годах XX в. на клетках мышей, крыс и человека, и было показано, что совместное культивирование тимоцитов с эпителиальными клетками тимуса приводит к индукции апоптоза тимоцитов, но на более поздних сроках, а именно 3—4 ч и позже (Rinner et al., 1996; Schreiber et al., 1996; Sharova et al., 2001; Vucevic et al., 2002). При этом на более ранних сроках исследования (1.5—2 ч) апоптоз не выявлялся (Schreiber et al., 1996; Vucevic et al., 2002). Расхождения с нашими результатами могут быть связаны с тем, что авторы этих работ использовали недостаточно чувствительные методы исследования — морфологический и выявление клеток, содержащих меньше чем 2N ДНК («суб-G<sub>1</sub> пик»), при окрашивании иодидом пропидия (Schreiber et al., 1996). Используемый нами метод окрашивания клеток с помощью YO-PRO-1 является более чувствительным. Этот флуоресцентный краситель поступает в цитоплазму через лигандзависимые ионные каналы P2RX 7 на ранних стадиях апоптоза, а в интактных клетках не накапливается (Stemberger et al., 2010).

Среди неадгезированных клеток относительное содержание тимоцитов, находящихся в фазе раннего апоптоза, не увеличивалось ни через 30, ни через 120 мин по сравнению с контролем при сокультивировании с клетками эпителия обеих линий (рис. 2, а, б, д, е). Эти данные свидетельствуют об относительной резистентности популяции неадгезированных клеток к апоптозу, на что указывают также и другие авторы (Schreiber et al., 1996; Mukamoto et al., 1999).

При сопоставлении динамики деадгезии клеток и апоптоза, индуцированного в результате контакта с эпителиальными клетками, оказалось, что эти процессы происходят с разной скоростью: за 1.5 ч доля адгезированных тимоцитов уменьшалась на 2 и 5 % на кортикальных и медуллярных клетках соответственно, а доля апоптозных клеток среди адгезированных тимоцитов увеличивалась на 6 и 17 % соответственно. Таким образом, скорость увеличения доли апоптозных клеток была в 3 раза выше, чем скорость деадгезии клеток, что предполагает отсутствие связи между этими процессами.

Содержание тимоцитов, находящихся в фазе позднего апоптоза (некроза), было выше среди неадгезированных клеток (7—8 %) по сравнению с контролем (4—6 %) и значительно снижено в популяции адгезированных клеток (1.5—3 %) (рис. 2, в—е). Этот показатель не зависел от времени культивирования (30—120 мин) и типа эпителия (кортикального или медуллярного). На основании этого можно предположить, что неадгезированные тимоциты, находящиеся на стадии позднего апоптоза, в адгезии не участвуют и представляют собой мертвые клетки, получившие механические повреждения в процессе пробоподготовки.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что апоптоз тимоцитов развивался в результате контакта с эпителиальными клетками, а не спонтанно и затрагивал в основном популяцию адгезированных клеток.

Распределение тимоцитов по экспрессии антигенов CD4 и CD8 в процессе адгезии. Фенотип тимоцитов, культивируемых совместно с клетками эпителия в течение 120 мин, изучали в трех группах клеток — адгезированных, неадгезированных и контрольных (культивируемых без эпителиальных клеток). Как показано на рис. 3, основной популяцией адгезированных клеток являлись незрелые лимфоциты CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; при этом относительное содержание зрелых CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-timoцитов уменьшалось на клетках эпителия обеих линий.

Наши результаты согласуются с данными, полученными другими авторами с использованием линий эпителиальных клеток крысиного и мышинного происхождения (Schreiber et al., 1996; Colic et al., 1998; Pezzi et al., 2016), что подтверждает адекватность использованной нами модели. Необходимость такого подтверждения связана с тем, что в наших исследованиях были использованы тимоциты от мышей-гибридов F1 (CBA × C57BL/6), а линии эпителиальных клеток были получены от мышей C57BL/6. Однако, согласно данным литературы, считается, что процесс адгезии тимоцитов к эпителиальным клеткам, так же как и сопровождающий его процесс развития апоптоза тимоцитов, не подвержены МНС-рестрикции и наблюдаются как в сингенной, так и в аллогенной системах (Singer et al., 1986; Guy et al., 1996), а также с клетками другого вида (Sharova et al., 2001). Таким образом, применение нашей модели можно считать вполне корректным.

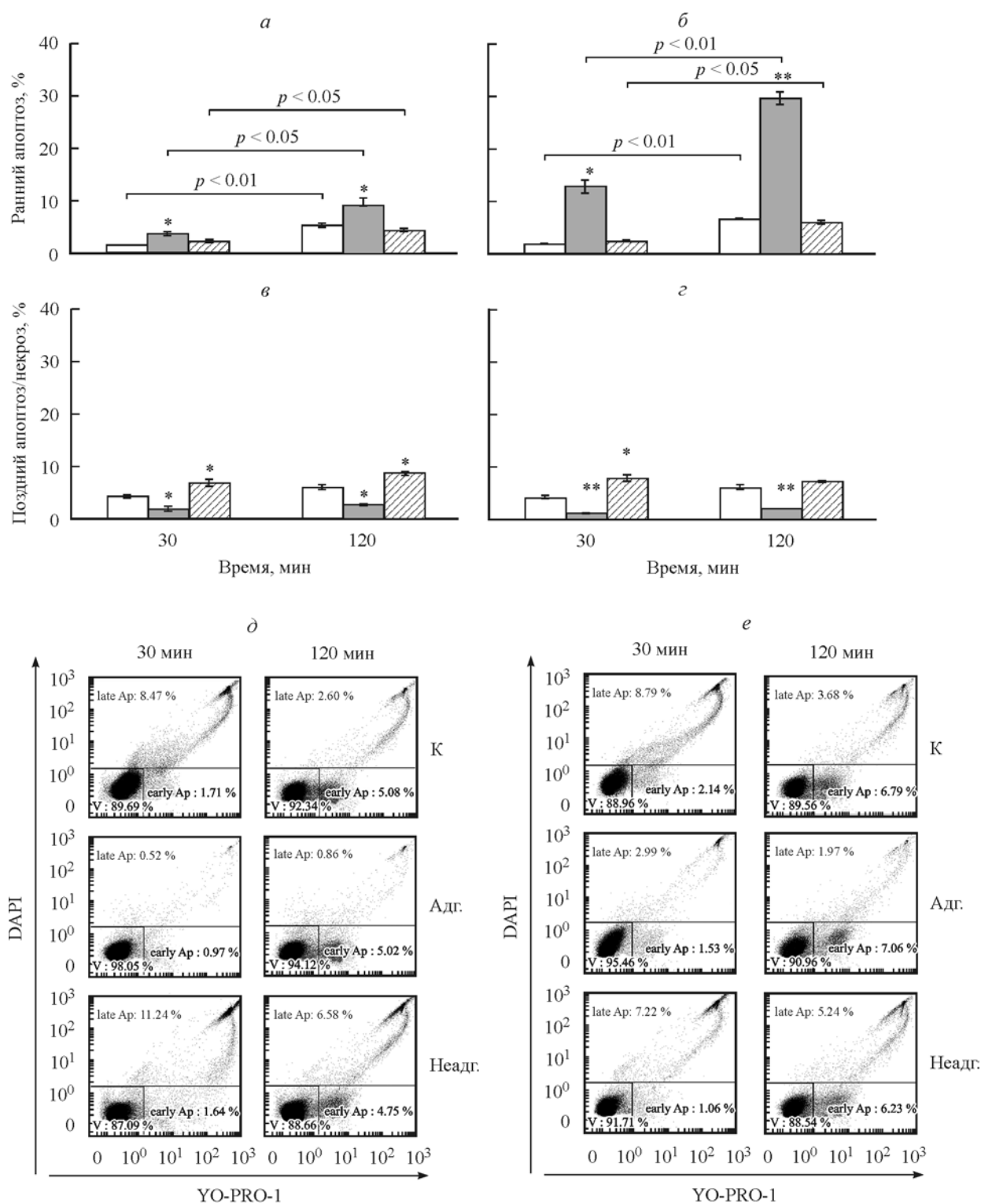


Рис. 2. Количество тимоцитов, находящихся в состоянии раннего (а, б) и позднего (в, г) апоптоза (некроза), в процессе адгезии к эпителиальным клеткам cTEC1-2 (а, в, д) или mTEC3-10 (б, г, е) по данным проточной цитометрии.

а-г: столбцы белые — контрольные, серые — адгезированные, затрихованные — неадгезированные тимоциты, приведены средние значения и их ошибки, n = 4. д, е — гистограммы проточной цитометрии одного из репрезентативных экспериментов; по горизонтали — интенсивность флуоресценции YO-PRO-1; по вертикали — интенсивность флуоресценции DAPI; область late Ap — клетки в состоянии позднего апоптоза (некроза), область early Ap — клетки в состоянии раннего апоптоза, область V — живые клетки. Здесь и далее показана достоверность различий при \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

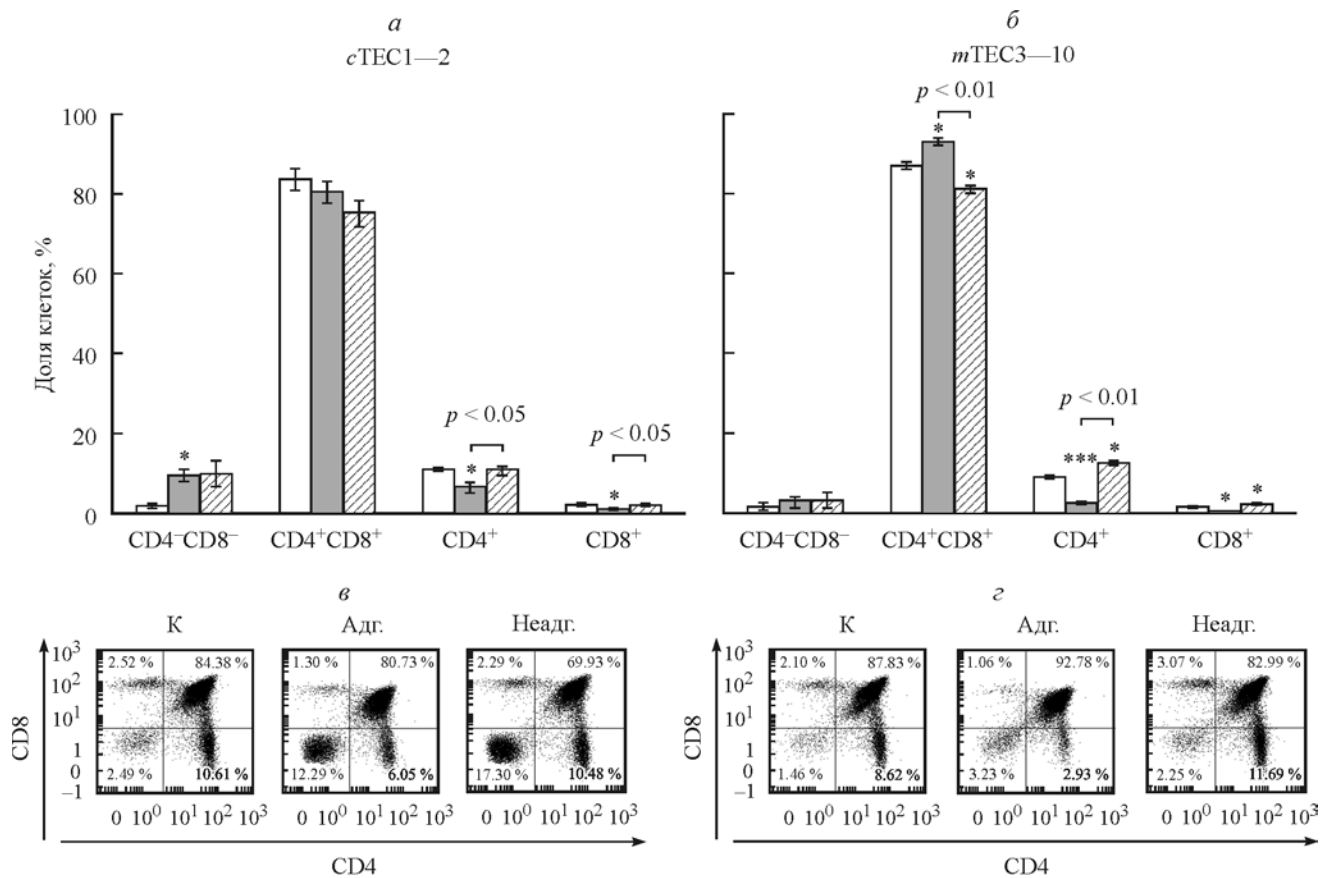


Рис. 3. Распределение тимочитов по экспрессии антигенов CD4 и CD8 в процессе адгезии (120 мин) к клеткам cTEC1-2 (а, в) и mTEC3-10 (б, г) по данным проточной цитометрии.

а, б: столбцы белые — контроль (тимочиты, культивируемые без эпителия), серые — адгезированные тимочиты, заштрихованные — неадгезированные; показаны средние величины и их ошибки,  $n = 4$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . в, г — результаты одного из репрезентативных экспериментов: К — контроль, Адг. — адгезированные тимочиты, Неадг. — неадгезированные; по горизонтали — интенсивность флуоресценции (ИФ) антител против CD4; по вертикали — ИФ антител против CD8; левый верхний квадрат содержит тимочиты с фенотипом CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, левый нижний — CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, правый верхний — CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, правый нижний — CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>.

Анализ экспрессии Nrp-1 и PlexA1 на тимочитах в процессе адгезии. Поскольку мы предположили, что Nrp-1 и PlexA1 могут участвовать в процессе адгезии тимочитов к клеткам эпителия, было исследовано относительное содержание клеток, несущих данные маркеры среди адгезированных и неадгезированных тимочитов. Содержание клеток Nrp-1<sup>+</sup> в контроле составляло более 50 %, а среди адгезированных клеток резко снижалось до 3 % после культивирования с эпителиальными клетками обеих линий (рис. 4, а—г).

Анализ относительного содержания клеток Nrp-1<sup>+</sup> среди четырех основных популяций тимочитов (см. таблицу) показал, что в контроле их содержание было наибольшим среди CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и наименьшим — среди CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-тимочитов. Среди адгезированных клеток (120 мин культивирования) этот показатель уменьшался неравномерно в разных популяциях: среди CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> — в 22 раза, среди остальных популяций — в 4—9 раз (см. таблицу).

Поскольку клетки с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> представляли собой основную популяцию прикрепляющихся клеток, наиболее выраженное снижение экспрессии Nrp-1 именно среди этой популяции тимочитов указывает на участие данной поверхностной молекулы в адгезии. При этом относительное содержание клеток Nrp-1<sup>+</sup> среди неадгезированных тимочитов не отличалось от контроля.

Nrp-1 является многофункциональным трансмембранным белком, который способен взаимодействовать с большим числом лигандов, среди которых наиболее хорошо изучены семафорин 3А и ростовой фактор сосудистого эндотелия (VEGF) (Chaudhary et al., 2014). Вместе с тем, Nrp-1 независимо от взаимодействия со своими основными лигандами может также образовывать комплексы с различными рецепторами на поверхности той же самой клетки. Было показано, что этот рецептор может взаимодействовать с  $\alpha 5\beta 1$  (VLA-5) интегрином и усиливать адгезию эндотелиальных и опухолевых клеток к фибронектину (Valdembri et al., 2009; Chen et al., 2014). Этот процесс сопровождается активным эндоцитозом комплекса Nrp-1 с интегрином VLA-5 в эндотелиальных клетках (Valdembri et al., 2009). Можно предположить, что выявленное нами резкое снижение содержания клеток Nrp-1<sup>+</sup> среди адгезированных тимочитов также связано с интернализацией этого рецептора с поверхности в результате контакта с эпителиальными клетками.

Описанные нами данные об уменьшении содержания Nrp-1<sup>+</sup> среди адгезированных тимочитов не согласуются с результатами других авторов, полученными на тимочитах человека. Так, было показано, что среди адгезированных тимочитов их относительное содержание с фенотипом Nrp-1<sup>+</sup>, наоборот, увеличивается после их культиви-

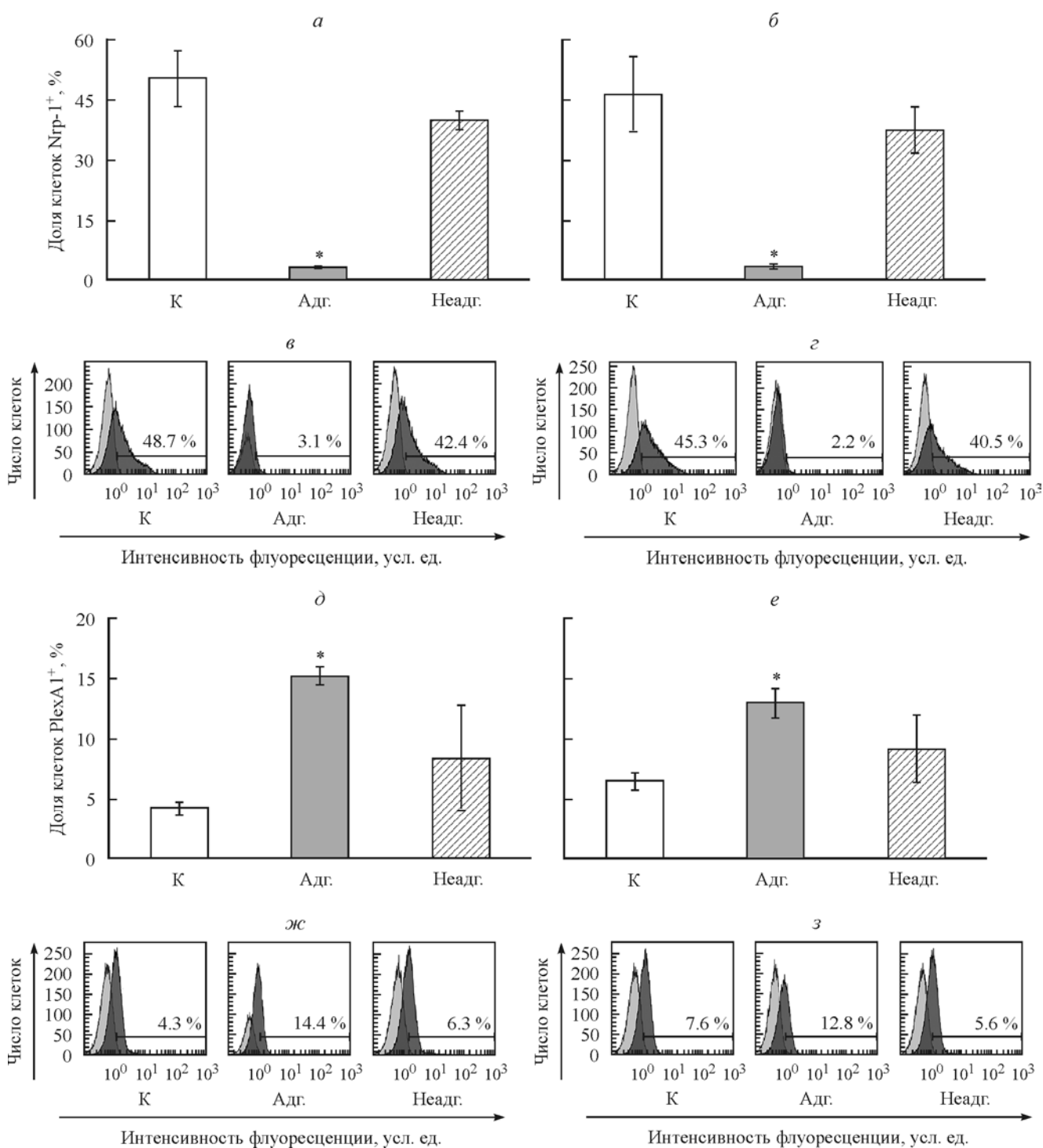


Рис. 4. Относительное содержание тимоцитов Npr-1<sup>+</sup> (а—г) и PlexA1<sup>+</sup> (д—з) в процессе адгезии (120 мин) к клеткам cTEC1-2 (а, в, д, ж) и mTEC3-10 (б, г, е, з) по данным проточной цитометрии.

На гистограммах а, б, д, е показаны средние значения и их ошибки, n = 4, в, г, ж, з — результаты одного из репрезентативных экспериментов: светлый цвет — антитела изотипического контроля, темный — антитела против Npr-1 (в, г) или PlexA1 (ж, з); выделена область клеток Npr-1<sup>+</sup> (в, г) PlexA1<sup>+</sup> (ж, з) и указано их содержание (%), сокращения по горизонтали те же, что и на рис. 3.

рования с эпителиальными клетками (Lepelletier et al., 2007).

Можно предположить, что данные расхождения связаны с особенностями экспрессии Npr-1 на тимоцитах у разных видов млекопитающих. Если у мышей относительное содержание клеток Npr-1<sup>+</sup> весьма значительно и составляет до 70 % всех тимоцитов (Corbel et al., 2007), то

у человека таких клеток всего лишь около 5 % (Lepelletier et al., 2007). Кроме того, у мышей Npr-1 считается маркером Т-регуляторных клеток (Sarris et al., 2008), что нехарактерно для Т-лимфоцитов человека (Milpied et al., 2009).

Содержание клеток PlexA1<sup>+</sup> среди адгезированных тимоцитов в противоположность клеткам Npr-1<sup>+</sup> увели-

**Изменение содержания тимоцитов Nrp-1<sup>+</sup> и PlexA1<sup>+</sup> среди основных популяций в процессе адгезии к клеткам сТЕС1-2 в течение 120 мин**

Популяция тимоцитов	Доля клеток с фенотипом, %			
	Nrp-1 <sup>+</sup>		PlexA1 <sup>+</sup>	
	контроль (без эпителия)	адгезированные клетки	контроль (без эпителия)	адгезированные клетки
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	44.20 ± 5.39	4.73 ± 2.55 <sup>a</sup>	5.27 ± 0.74	12.10 ± 3.39
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	54.07 ± 7.77	2.43 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.49	14.93 ± 0.73 <sup>b</sup>
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	24.63 ± 3.07	3.33 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.75	15.27 ± 2.02 <sup>a</sup>
CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	17.03 ± 6.04	4.30 ± 1.07	5.27 ± 1.29	17.57 ± 2.43 <sup>a</sup>

Примечание. Представлены средние величины и их ошибки из трех независимых экспериментов. <sup>a, б</sup> Различия по сравнению с контролем достоверны при  $P < 0.05$  и  $P < 0.01$  соответственно.

чивалось в результате культивирования с эпителиальными клетками обеих линий (сТЕС1-2 и mТЕС3-10) (рис. 4, д—з). Так, в контроле содержание клеток-PlexA1<sup>+</sup> составляло 4—6 %, а среди адгезированных — 12—15 %. При этом относительное содержание клеток PlexA1<sup>+</sup> среди неадгезированных тимоцитов не отличалось от контроля. Анализ содержания клеток PlexA1<sup>+</sup> по четырем основным популяциям показал, что во всех группах в контрольных культурах доля клеток PlexA1<sup>+</sup> была приблизительно одинаковой, а среди адгезированных равномерно увеличивалась в 3—4 раза (см. таблицу).

Таким образом, полученные нами данные указывают на участие обеих молекул (Nrp-1 и PlexA1) в адгезии, причем их экспрессия на поверхности адгезированных тимоцитов за 2 ч культивирования изменялась противоположным образом.

Влияние антител к Nrp-1 на адгезию тимоцитов к эпителиальным клеткам тимуса. Преинкубация тимоцитов с антителами повышала их адгезию к клеткам эпителия обеих линий на 10 % (рис. 5). Можно предположить, что обработка антителами к Nrp-1 создает условия для более эффективного участия интегринов в процессе адгезии. В том случае, когда антителами обрабатывали не тимоциты, а клетки эпителия, эффекта не было. Это можно объяснить тем, что нейропилиновые рецепторы находятся в основном на тимоцитах, а на клетках эпителия их экспрессия невелика (Рутто и др., 2016).

Nrp-1 и PlexA1 в настоящее время рассматриваются как рецепторы нейронального и иммунорегуляторного фактора семафорина 3А (Takamatsu, Kumanogoh, 2012). Между тем они первоначально были описаны в качестве адгезионных молекул. Так, было показано, что плексины участвуют в осуществлении клеточных контактов нейрональных клеток (Fujisawa et al., 1997), а нейропилин опосредует агрегацию фибробластов (Takagi et al., 1995). Позднее установили, что Nrp-1 мыши имеет два сайта межклеточной адгезии, которые располагаются в доменах b1 и b2 и связываются с неидентифицированным белковым лигандом на мембране других клеток (Shimizu et al., 2000). В иммунной системе Nrp-1 участвует во взаимодействиях Т-лимфоцитов и дендритных клеток человека, на поверхности которых он экспрессируется, и опосредует их контакт по типу гомофильного взаимодействия (нейропилин—нейропилин) (Tordjman et al., 2002). Таким образом, Nrp-1 и PlexA1 являются не только рецепторами семафорина 3А, но, кроме этого, способны участвовать в осуществлении межклеточных контактов в нервной и иммунной системах в качестве самостоятельных адгезионных молекул в отсутствие семафорина 3А (Li et al., 2014). Полученные нами данные также указывают на общность механизмов межклеточных взаимодействий, происходящих в нервной и иммунной системах и позволяют по-новому рассматривать участие этих молекул в процессе адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса.

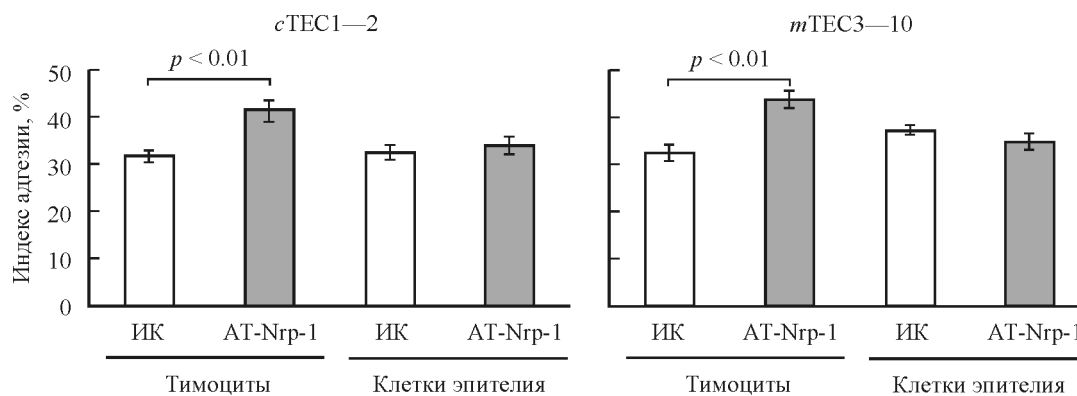


Рис. 5. Влияние преобработки тимоцитов с помощью антител к Nrp-1 (AT-Nrp-1) на их адгезию к клеткам сТЕС1-2 и mТЕС3-10 в течение 30 мин.

ИК — изотипический контроль.

Таким образом, в настоящем исследовании был проанализирован процесс адгезии тимоцитов мышей к клеткам кортикального и медуллярного эпителия тимуса. Было показано, что максимальный индекс адгезии наблюдался при 30 мин культивирования, после чего этот показатель снижался. Основной популяцией адгезированных клеток являлись незрелые лимфоциты CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Апоптоз тимоцитов развивался в основном в результате контакта с эпителиальными клетками (а не спонтанно) и затрагивал популяцию адгезированных клеток. Увеличение содержания тимоцитов в ранней фазе апоптоза было впервые зарегистрировано уже через 30 и 120 мин культивирования. Процессы деадгезии и апоптоза, индуцированного в результате контакта с эпителиальными клетками, происходили с разной скоростью, что предполагает отсутствие связи между ними. Впервые показано участие Nrp-1 и PlexA1 в адгезии тимоцитов к клеткам эпителия тимуса в качестве самостоятельных молекул в отсутствие их основного лиганда семафорина 3А.

При сравнении данных, полученных на разных линиях эпителия (сTEC1-2 и mTEC3-10), не было выявлено существенной разницы ни по динамике и уровню адгезии, ни по популяционному составу клеток, участвующих в адгезии. Различия касались только значительно более выраженной индукции раннего апоптоза в адгезированных тимоцитах при культивировании с клетками mTEC3-10. Это может быть связано с тем, что *in vivo* клетки CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> не контактируют с эпителием медуллярной зоны, поскольку в ней присутствуют только более зрелые тимоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>.

Представленные в настоящей работе результаты имеют существенное значение для лучшего понимания межклеточных взаимодействий в процессе созревания тимоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-06150).

### Список литературы

- Надеев А. Д., Кудрявцев И. В., Серебрякова М. К., Авдонин П. В., Зинченко В. П., Гончаров Н. В. 2015. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода. Цитология. 57 (12): 909—916. (Nadeev A. D., Kudryavtsev I. V., Serebriakova M. K., Avdonin P. V., Zinchenko V. P., Goncharov N. V. 2016. Dual proapoptotic and pro necrotic effect of hydrogen peroxide on human umbilical vein endothelial cells. Cell Tissue Biol. 2 : 145—151.)
- Рутто К. В., Лямина И. В., Кудрявцев И. В., Киселева Е. П. 2016. Регуляция продукции фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в клеточных линиях эпителия тимуса мыши. Цитология. 58 (6) : 436—443. (Rutto K. V., Lyamina I. V., Kudryavtsev I. V., Kiseleva E. P. 2016. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) production in mouse thymic epithelial cell lines. Cell Tissue Biol. 10 : 436—443.)
- Chaudhary B., Khaled Y. S., Ammori B. J. 2014. Neuropilin-1: function and therapeutic potential in cancer. Cancer Immunol. Immunother. 63 : 81—99.
- Chen L., Miao W., Zhang H., Zeng F., Cao C., Qiu R., Yang J., Luo F., Yan J., Lv H., Xu Q. 2014. The inhibitory effects of a monoclonal antibody targeting neuropilin-1 on adhesion of glioma cells to fibronectin. J. Biomed. Nanotechnol. 10 : 3373—3380.
- Colic M., Vucevic D., Miyasaka M., Tamatani T., Pavlovic M. D., Dujic A. 1994. Adhesion molecules involved in the binding and subsequent engulfment of thymocytes by a rat thymic epithelial cell line. Immunology. 83 : 449—456.
- Colic M., Vucevic D., Popovic P., Dujic A. 1998. Bidirectional interactions between thymocytes and thymic epithelial cell lines *in vitro*. Develop. Immunol. 6 : 71—79.
- Corbel C., Lemarchandel V., Thomas-Vaslin V., Pelus A.-S., Agboton C., Romeo P.-H. 2007. Neuropilin 1 and CD25 co-regulate during early murine thymic differentiation. Develop. Comp. Immunol. 31 : 1082—1094.
- Fujisawa H., Ohta K., Kameyama T., Murakami Y. 1997. Function of a cell adhesion molecule, plexin, in neuron network formation. Develop. Neurosci. 19 : 101—105.
- Guy R., Gafanovich I., Rosenheimer N., Oron E., Yefenof E., Zilberman Y. 1996. MHC non-restricted, CD25-independent apoptosis of immature thymocytes induced by thymic epithelial cells. Cell. Death Differ. 3 : 431—438.
- He H.-T., Naquet P., Caillol D., Pierres M. 1991. Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca<sup>2+</sup>-independent mechanism. J. Exp. Med. 173 : 515—518.
- Kasai M., Hirokawa K., Kejino K., Ogasawara K., Tsumi M., Hermel E., Monaco J. J., Mizuuchi T. 1996. Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells. Eur. J. Immunol. 26 : 2101—2107.
- Klein L. 2009. Dead man walking: how thymocytes scan the medulla. Nat. Immunol. 10 : 809—811.
- Klein L., Kyewski B., Allen P. M., Hogquist K. A. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). Nat. Rev. Immunol. 14 : 377—391.
- Lepelletier Y., Smaniotta S., Hadj-Slimane R., Villa-Verde D. M., Nogueira A. C., Dardenne M., Hermine O., Savino W. 2007. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interaction. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104 : 5545—5550.
- Li X., Parker M., Kooi C. W. V. 2014. Control of cellular motility by neuropilin-mediated physical interactions. Biomol. Concepts. 2 : 157—166.
- Milpied P., Renand A., Bruneau J., Mendes-da-Cruz D. A., Jacquelin S., Asnafi V., Rubio M.-T., MacIntyre E., Lepelletier Y., Hermine J. 2009. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3<sup>+</sup> Treg. Eur. J. Immunol. 39 : 1466—1471.
- Mukamoto M., Okada T., Kodama H., Baba T. 1999. Effects of chicken thymic stromal cells on the growth and differentiation of thymocytes *in vitro*. Vet. Immunol. Immunopathol. 68 : 25—37.
- Pezzi N., Assis A. F., Cotrim-Sousa L. C., Lopes G. S., Mosella M. S., Lima D. S., Bombonato-Prado K. F., Passos G. A. 2016. Aire knockdown in medullary thymic epithelial cells affects Aire protein, deregulates cell adhesion genes and decreases thymocyte interaction. Mol. Immunol. 77 : 157—173.
- Rinner I., Eren R., Skreiner E., Kukulansky T., Kasai M., Hirokawa K., Globerson A., Schauenstein K. 1996. Thymocyte-directed enhancement of apoptosis via soluble factor(s) derived from a cortical and a medullary thymic epithelial cell line. Cell Tissue Res. 284 : 327—330.
- Sarris M., Andersen K. G., Randow F., Maya L., Betzl A. G. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. Immunity. 28 : 402—413.
- Savino W., Mendes-da-Cruz D. A., Silva J. S., Dardenne M., Cotta-de-Almeida V. 2002. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines. Trends Immunol. 23 : 305—313.
- Schreiber L., Sharabi Y., Schwartz D., Golfinger N., Brodie C., Rotter V. 1996. Induction of apoptosis and p53 expression in immature thymocytes by direct interaction with thymic epithelial cells. Scand. J. Immunol. 44 : 314—322.
- Sharova N. I., Dzutsev A., Litvina M. M., Pleskovskaya G. N., Kharchenko T. Y., Yarilin A. A. 2001. Thymic epithelial cells induce Fas-independent activation apoptosis of thymocytes. Immunol. Lett. 78 : 201—207.
- Shimizu M., Murakami Y., Suto F., Fujisawa H. 2000. Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. J. Cell Biol. 148 : 1283—1293.



Singer K. H. 1990. Interactions between epithelial cells and T lymphocytes: role of adhesion molecules. *J. Leuk. Biol.* 48 : 367—374.

Singer K. H., Wolf L. S., Lobach D. F., Denning S. M., Tuck D. T., Robertson A. L., Haynes B. F. 1986. Human thymocytes bind to autologous and allogeneic thymic epithelial cells *in vitro*. *Immunology*. 83 : 6588—6592.

Stemberger J., Witt V., Printz D., Geyeregger R., Fritsch G. 2010. Novel single-platform multiparameter FCM analysis of apoptosis: significant differences between wash and no-wash procedure. *Cytometry A*. 77 : 1075—1081.

Takagi S., Kasuya Y., Shimizu M., Matsuura T., Tsuboi M., Kawakami A., Fujisawa H. 1995. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Develop. Biol.* 170 : 207—222.

Takamatsu H., Kumanogoh A. 2012. Diverse roles for semaphorin — plexin signaling in the immune system. *Trends Immunol.* 33 : 127—135.

Tordjman R., Lepelletier Y., Lemarchandel V., Cambot M., Gaulard P., Hermine O., Romeo P.-H. 2002. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* 3 : 477 : 482.

Valdembri D., Caswell P. T., Anderson K. I., Schwarz J. P., Konig I., Astanina E., Caccavari F., Norman J. C., Humphries M. J., Bussolino F., Serini G. 2009. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates  $\alpha 5 \beta 1$  integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* 7 : e1000025.

Vucevic D., Colic M., Popovic P., Gasic S. 2002. Different roles of a rat cortical thymic epithelial cell line *in vitro* on thymocytes and thymocyte hybridoma cells: phagocytosis, induction of apoptosis, nursing and growth promoting activities. *Develop. Immunol.* 9 : 63—72.

Yarilin A. A., Sharova N. I., Dzutzzev A. K. 1990. Interaction between T lymphocytes and epithelial cells in thymus. *Russ. J. Immunol.* 4 : 224—228.

Поступила 6 II 2018

#### ADHESION OF THYMOCYTES TO THYMIC EPITHELIAL CELL LINES, INVOLVEMENT OF NEUROPILIN-1 AND PLEXIN A1 IN THIS PROCESS

K. V. Rutto,<sup>1,\*</sup> I. V. Kudryavtsev,<sup>1</sup> E. P. Kisseleva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376, and

<sup>2</sup> North-Western Federal Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, 191015;

\* e-mail: krispins-90@mail.ru

Thymic epithelial cells play not only important structural role but also generate microenvironment that is necessary for thymocyte maturation. The process of thymocyte differentiation is based on direct cell-cell contact with epithelial cells and is not well studied in particular the process of adhesion. The aim of the study was to evaluate the interaction of thymocytes with two murine thymic epithelial cell lines — cortical cTEC1-2 and medullar mTEC3-10 cells. The study of thymocytes included: assessment of the adhesion processes, apoptosis, and population content as well as receptor expression — neuropilin 1 (Nrp-1) and Plexin A1 (PlexA1) among adherent, non-adherent and control cells, cultivated without epithelial cells. Maximal adhesion index was observed at 30 min co-cultivation, after that index of adhesion decreased. Immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes were the main population of adherent cells, while the content of mature CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> thymocytes decreased compared to control. It was shown for the first time that percent of thymocytes in early apoptosis phase increased among adherent cells as compared to control as early as after only 30 and 120 min of their co-cultivation. Further, we showed that in adherent thymocytes Nrp-1 was down-regulated while PlexA1 was up-regulated compared to control after adhesion to epithelial cells. Preincubation of thymocytes with anti-Nrp-1 antibodies enhanced their adhesion to epithelial cells. The data obtained show for the first time that receptors Nrp-1 and PlexA1 participated in the process of thymocyte adhesion to murine thymic epithelial cells as independent molecules, in the absence of their main ligand — semaphorin 3A.

Key words: epithelial cells, cTEC1-2, mTEC3-10, thymocytes, adhesion, apoptosis, Nrp-1, PlexA1.