МНС-РЕСТРИКЦИЯ И АЛЛОГЕННЫЙ ОТВЕТ

©2004 г. Д. Б. Казанский

Лаборатория механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза, Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Каширское шоссе, д. 24. Email kazansky@dataforce.net

Открытие феномена МНС-рестрикции дало ключ к пониманию того, как Тлимфоциты распознают антигены патогенных бактерий, вирусов и опухолевых клеток. Молекулы МНС являются естественными лигандами для связывания пептидов экзогенного и эндогенного происхождения, комплексы которых распознаются рецепторами Т-клеток, специфически взаимодействующими как с самой молекулой МНС, так и с пептидом. До последних лет была общепринятой интерпретация, согласно которой МНС-рестрикция является следствием «адаптивной дифференцировки» в тимусе, «обучающей» формирующийся репертуар Т-лимфоцитов низкоаффинному взаимодействию с собственными молекулами МНС в ходе позитивной селекции. Эта интерпретация была основана на экспериментах с радиационными химерами, у которых иммунная система была восстановлена пересадкой клеток костного мозга полуаллогенных животных. Последующие эксперименты, проведенные в лаборатории Рольфа Цинкернагеля, показали, что интерпретация их результатов является следствием экспериментального артефакта, связанного с неполным удалением предшественников Т-клеток реципиента и неравенством их «стартовых условий» по сравнению с трансплантированными клетками донора. Теория «адаптивной дифференцировки» оказалась неспособной дать убедительное объяснение феноменам прямого аллогенного и аллорестриктированного распознавания. Ряд новых данных, моделях селекции Т-клеточного репертуара у животных с трансгенными ТСР, экспрессией индивидуальных комплексов молекула МНС/пептид и реципиентах ксеногенного тимуса, свидетельствует о высокой гибкости в приспособлении к различному микроокружению, а также низкой специфичности позитивной селекции, что делает предпочтительным альтернативное объяснение МНС-рестрикции. МНС-рестрикция феномена Согласно ему обусловлена специфичностью пула эффекторных клеток, активированных первичной иммунизацией. Молекулярная основа этого эффекта детально разработана группой H.G.Rammensee и состоит в различиях мотивов в первичной структуре пептидов, необходимых для связывания с разными аллельными формами молекул МНС. Т-лимфоцитов формируется в тимусе в результате случайной реаранжировки герминальных последовательностей генных сегментов TCR и других механизмов увеличения их разнообразия, сопровождающих процесс рекомбинации. Как показано группой D. Raulet, такой пре-селектированный репертуар Т-лимфоцитов обладает врожденной способностью реагировать с различными аллельными формами молекул МНС и содержит потенциально аутоагрессивные клоны. В отличие от герминальных последовательностей генных сегментов TCR молекулам свойственен значительный внутривидовой полиморфизм. Поэтому последующие процессы негативной и позитивной селекции имеют целью адаптацию преселектированного репертуара к окружению молекул МНС конкретного индивидуума, основной целью которой является устранение аутореактивных клонов с сохранением широкого спектра специфичности к потенциальным патогенам. В этом свете тимусную селекцию можно рассматривать как аллогенную реакцию пре-селектированного

репертуара на собственные молекулы МНС, идущую в течение всей жизни хозяина, а реакции зрелого репертуара Т-клеток на индивидуальные антигенные пептиды - как частные случаи трансплантационных реакций. По всей видимости, такое понимание проблемы устраняет внутренние конфликты в существующих представлениях о МНС-рестрикции и раскрывает возможную природу и значение аллогенных реакций, в свое время создавших множество помех ее первооткрывателям.

1. Открытие феномена МНС-рестрикции.

Зависимость иммунного ответа и иммунологического распознавания от молекул МНС класса I в ответе на вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) была показана Цинкернагелем и Догерти в 1974 [1]. Как Цинкернагель описывал в своей Нобелевской лекции, их работа, ставшая основанием для гипотезы МНС-рестрикции, стала возможной в результате разработки цитотоксического теста для оценки Т-клеточных ответов на клетки, инфицированные LCMV. Вначале этот тест использовали для того, чтобы понять, существует ли корреляция между Т-клеточным ответом на LCMV и тяжестью хориоменингита. \mathbf{C} этой целью Догерти извлекал несколько микролитров цереброспинальной жидкости из cysterna magna мыши, а Цинкернагель исследовал цитотоксичность выделенных из нее клеток с использованием разработанного им микрометода для определения освобождения $^{51}{\rm Cr}$ из инфицированных мишеней. Эти Т-клетки, специфически разрушающие инфицированные эксперименты показали, что мишени, обнаруживаются в цереброспинальной жидкости инфицированных нормальных мышей, но не бестимусных мышей nude и могут быть главным патогенетическим механизмом, вызывающим летальный хориоменингит. Статья, описывающая эти открытия, была опубликована ими в 1973 г. в Journal of Experimental Medicine, где в том же году вышла статья Олдстона и Мак-Девитта, показывающая, что линии мышей, различающиеся по генам MHC. разной чувствительностью К развитию заболевания интрацеребрального инфицирования LCMV [2, 3]. Эта работа побудила Цинкернагеля и Догерти провести дополнительные эксперименты на инбредных линиях мышей и их гибридах, доступных в тот момент в Школе медицинских исследований Джона Картина, где в тот момент работали оба исследователя. Оказалось, что хотя мыши всех линий погибали от хориоменингита после интрацеребрального инфицирования LCMV, далеко не у всех линий мышей удавалось обнаружить в селезенке активность вирусспецифических CTL. Этот результат мог означать, что либо CTL не вовлечены в патогенез летального хориоменингита либо в руках у исследователей неадекватный тест. Верным оказалось второе предположение. По счастливому стечению обстоятельств клеточная линия L929, на которой тестировали вирусиндуцированные ответы произошла из мышиной линии С3H (H-2^k), молекулы МНС которой совпадают с молекулами МНС линии CBA(H-2^k), наиболее часто использованной в экспериментах. Таким образом, использованный тест показал, что клетки селезенки всех мышей с гаплотипом H-2^k, включая гибридов первого поколения с другими линиями, лизируют клетки $L929 (H-2^k)$, инфицированные вирусом, но не лизируют неинфицированные мишени и мишени, инфицированные посторонним вирусом. Спленоциты иммунных мышей других гаплотипов были неспособны к этому. Далее важно было показать, что иммунные лимфоциты других линий мышей способны убивать вирусинфицированные клетки-мишени соответствующего типа МНС. Это предположение было вскоре подтверждено, используя в качестве мишеней перитонеальные макрофаги различных мышиных линий, которые было легко инфицировать LCMV и метить 51 Cr. Иммунные Т-лимфоциты мышей гаплотипа $H-2^b$ лизировали инфицированные макрофаги мышей гаплотипа H-2^b, но не других.

В начале 70-х годов прошлого века биологическая функция трансплантационных антигенов была неизвестна. Трансплантационные антигены были определены благодаря

работам Горера и Снелла и ряда других исследователей, получивших множество инбредных линий мышей с целью определить законы трансплантации и отторжения трансплантатов [4, 5]. Доссе и ван Руд обнаружили сходные антигены на поверхности лимфоцитов человека и назвали антигенами лимфоцитов человека (HLA) [6, 7]. Множество пациентов было типировано по трансплантационным антигенам и стало ясно, что чувствительность к некоторым заболеваниям связана с типами трансплантационных антигенов. В работах Бенацеррафа, Мак-Девитта и Лилли было обнаружено, что инбредные линии морских свинок и мышей различаются в интенсивности их ответов на некоторые изученные модельные антигены и опухолевые клетки [8-11]. Благодаря доступности широкого ряда линий мышей эти различия легко картировались в МНС и его субрегионах. Важной вехой в изучении физиологической роли MHC стала идентификация локусов MHC класса II как генов иммунного ответа (Ir), поскольку они, как оказалось, определяют способность организма к гуморальному иммунному ответу на индивидуальные синтетические полипептиды [9]. Эти открытия к моменту появления работы Цинкернагеля и Догерти широко обсуждались. Предполагалось, что полиморфизм МНС связан с необходимостью предотвратить трансмиссию опухолевых клеток [12] или избежать имитации трансплантационных антигенов вирусами и другими патогенами и, таким образом, избежать исчезновения вида [13, 14]. Предполагалось также, что трансплантационные антигены функционируют как генераторы разнообразия иммунных рецепторов. Эта гипотеза, предложенная Ерне, предполагала, что стволовые клетки животного несут полный набор V-генов, определяющих иммунных рецепторов, направленных против всего набора гистосовместимости вида. Пролиферация в первичных лимфоидных органах ведет к аутореактивных супрессии запрещенных клонов отбору мутантных экспрессирующих V-гены, измененные соматическими мутациями. Другая часть репертуара со специфичностью к посторонним трансплантационным антигенам, не представленным в организме индивидуума, ответственна за аллоагрессию [15]. Наиболее прозорливое предположение было сформулировано Лоуренсом в 1959 – он предположил, что инфекционные агенты связываются с трансплантационными антигенами и формируют комплекс «своего» и «чужого» [16].

Основываясь на результатах своих ранних экспериментов, показывающих двойную специфичность Т-клеток к МНС и к вирусу, Цинкернагель и Догерти поняли, что обнаружили нечто очень важное – они не только определяли биологическую функцию МНС, но и поддерживали ряд ранних наблюдений: Т-клеточных ответов на LCMV и вирусы лейкемии и эктромелии. Простота анализа in vitro, параллельная работа Г. Ширера, показавшая предпочтительное распознавание сингенных мишеней, меченных ТНФ, Т-лимфоцитами, иммунными к тринитрофенолу (ТНФ) [17], воспроизводимость на других моделях – вирусов эктромелии и осповакцины [18, 19], Н-Y антигена [20] и минорных антигенов гистосовместимости [21] — убедили иммунологов в том, что МНС-рестриктированное распознавание не ограничивается частными случаями, а имеет всеобщий характер. Авторы предположили, что основная функция молекул МНС состоит в том, чтобы сигнализировать иммунной системе об изменениях собственных молекул МНС [22].

Открытия МНС-рестриктированного взаимодействия СТL с мишенями были распространены также на хелперные клетки, предполагая, что они могли бы распознавать антигениндуцированные изменения молекул МНС класса II на В-лимфоцитах и макрофагах. Очень важно то, что полученные результаты предложили объяснение причин обширного полиморфизма молекул МНС, который сводит к минимуму возможность того, что какиелибо патогены создадут неиммуногенные модификации молекул МНС и, таким образом, вызовут общую неотвечаемость популяции. Но лишь к середине 80-х благодаря работам Унаню, Грея, Таунсенда и Марьянского сформировалось представление о том, что

трансплантационные антигены, кодируемые МНС, являются антигенпрезентирующими молекулами и распознаются в комплексе с антигенными пептидами [23-26]. Реальность существования таких пептидов стала очевидной в результате работ Рамменси и соавторов, элюировавших их из молекул МНС клеток-мишеней [27], и кристаллографических работ Бьоркмана, Вильсон и Вайли, обнаруживших в молекулах МНС желобок для связывания пептида, а затем создавших рентгеноструктурную реконструкцию комплекса ТСR с молекулой МНС и пептидом [28, 29].

2. Происхождение МНС-рестрикции: адаптивная дифференцировка или следствие примирования?

МНС-рестрикция является экспериментальным наблюдением, при котором Т-лимфоциты распознают антиген в ассоциации с одним аллельным продуктом, закодированным в генах МНС, но не с другим. Это определение МНС-рестрикции дает Р. Шварц в 15 главе «Иммунологии» Уильяма Пола 1984 года издания [30]. Выход этой главы в свет отделяют 10 лет от открытия базового феномена МНС-рестрикции и 12 лет до решения Нобелевского комитета и она в полной мере отражает широту и накал дискуссий, шедших в то время по этой проблеме. Наибольшее количество споров вызывали гипотезы о происхождении МНС-рестрикции. Стремление автора представить все конфликтующие точки зрения и результаты исследований того времени сделали эту главу весьма сложной для понимания и поэтому мне остается адресовать к ней лишь в высшей степени заинтересованного и добросовестного читателя.

Сторонники гипотезы «адаптивной дифференцировки» или онтогенетической модели происхождения МНС-рестрикции ставили ее в зависимость от распознавания Т-клетками молекул МНС, представленных в организме животного [31]. Согласно модели «адаптивной дифференцировки» Т-лимфоциты в норме рестриктированы только сингенными молекулами МНС, так как только эти молекулы представлены при созревании Тклеток. В пользу этой гипотезы свидетельствовали данные, полученные на костномозговых химерах, полученных путем введения костного мозга гибридов F_1 облученным реципиентам родительской линии [32-34]. В экспериментах такие химеры отвечали преимущественно на (минорные антигены гистосовместимости либо вирус осповакцины), антигены ассоциированные с МНС реципиента. Это противоречило модели «первичной иммунизации», которая постулировала способность Т-клеток распознавать антиген в ассоциации с молекулами МНС любого гаплотипа [35, 36]. Согласно модели первичной МНС-рестрикция является следствием селекиии пролиферирующих в ответе на антиген в результате первичного распознавания конкретной комбинации молекула МНС/пептид.

В целом экспериментальный подход первой группы исследователей заключался в том, что реципиентов родительской линии мышей P_1 подвергали летальной дозе облучения и затем иммунную систему облученых животных восстанавливали клетками костного мозга полуаллогенных реципиентов F_1 , из которых были тщательно удалены зрелые Т-лимфоциты. Таким образом, получали животных, у которых, как предполагалось, клетки гемопоэтического происхождения происходят от донора (F_1), тогда как все остальные клетки организма, в том числе эпителий тимуса, сохраняют свойства клеток реципиента (P_1). Оказалось, что развитие Т-клеточного репертуара у таких животных приводит к сужению репертуара зрелых Т-клеток по сравнению с репертуаром, в норме представленным у донора, и преимущественному распознаванию антигенов в контексте молекул МНС, представленных у реципиента. Этот факт сначала был отмечен Беваном, исследовавшим ответы на минорные антигены гистосовместимости [32], а затем Цинкернагелем — в ответе химер C57BL/6,

восстановленных костным мозгом F₁(bm1 x B6), на вирус осповакцины [33]. Вместе с тем Бланден и Эндрю обнаружили, что у таких химер рестрикция по МНС реципиента не всегда абсолютна. Они исследовали ответ CTL на вирус эктромелии у 53 индивидуальных химер и лишь в 10 случаях была обнаружена рестрикция исключительно по молекулам МНС реципиента Р₁. У всех остальных реципиентов наблюдался значительный лизис инфицированных мишеней с гаплотипами и P_1 и P_2 [37]. Критические эксперименты, показавшие роль тимуса в формировании МНС-рестрикции, были представлены Цинкернагелем. В этом случае у мышей реципиентов P_1 до облучения удаляли тимус, затем подвергали летальной дозе облучения и вводили костный мозг мышей F_1 , из которого были тщательно удалены Т-лимфоциты. Затем таким мышам пересаживали доли облученного тимуса от гибридов F_1 либо какой-либо из родительских линий P_1 или P_2 . Оказалось, что специфичность рестрикции CTL, индуцированных у таких животных иммунизацией вирусом определяется МНС-фенотипом радиорезистентных осповакцины, клеток трансплантированного тимуса [38, 39].

Однако было также показано, что рестрикционная специфичность Т-клеточного репертуара у полуаллогенных химер может в значительной мере зависеть от динамики появления АПК костномозгового происхождения в тимусе реципиента. У таких химер АПК донорского типа (F₁) появляются в тимусе реципиента (P₁) через 2 месяца после пересадки костного мозга. Если в этот момент устранить периферические Т-клетки (рестриктированные по МНС P₁), то новые Т-клетки, эмигрирующие из тимуса, будут иметь рестрикцию по антигенам МНС обоих родителей.[40]. Позднее было подтверждено, что позитивная селекция в тимусе не является критически зависимой от эпителия тимуса и может поддерживаться другими типами клеток.[41, 42]. Более того, позитивная селекция может успешно идти даже в отсутствие молекул МНС и опосредованного ими сигнала через корецептор в результате взаимодействия с антителами к CD3 или к клонотипу. Единственным условием успешности протекания такой селекции является низковалентное связывание TCR, не вызывающее его агрегации. [43].

Попытки воспроизвести результаты, полученные на полуаллогенных химерах, на животных, полностью несовместимых по МНС, закончились полным провалом. Оказалось, что у полностью аллогенных химер развивается репертуар, рестриктированный либо молекулами МНС донора, либо реципиента [44]. В другой модификации эксперимента мышей F_1 тимэктомировали и пересаживали трансплантат тимуса P_1 , а затем облучали и восстанавливали костным мозгом мышей P_2 , лишенным Т-клеток. Восстановление приводило к формированию функционального репертуара Т-клеток, способного к ответам на посторонний аллоантиген. После иммунизации in vivo и последующей рестимуляции суспензиями инактивированного вируса Сендай во всех случаях индуцировались СТL, рестриктированные по молекулам МНС родителя P_2 , и лишь в некоторых — родителя P_1 , от которого был взят трансплантат тимуса [45].

Неудачными оказались также попытки обнаружить влияние трансплантированного аллогенного тимуса на МНС-рестрикцию Т-клеточного репертуара у мышей пиde, которые, казалось бы, являются идеальной моделью для изучения этого феномена. Пересадка аллогенного тимуса мышам пude приводила к развитию репертуара, рестриктированного молекулами МНС реципиента. [46].

Очевидные противоречия в экспериментальных данных были подробно обсуждены Альфредом Сингером и Полли Матцингер. В своих обзорах они подняли несколько ключевых вопросов, отражают ли результаты, полученные на химерах: 1) истинную позитивную селекцию репертуара Т-клеточных рецепторов молекулами МНС тимусного

эпителия независимо от иммунизирующего антигена; 2) «супрессорные механизмы», комбинацией аллогенной клеток, происходящих ИЗ трансплантатов тимуса и использованного облученного либо бестимусного реципиента; 3) специфичность, определяемую только иммунизирующим антигеном, представленным АПК костномозгового происхождения; или 4) комбинацию всех этих возможностей [47, 48]. Несмотря на неоднозначность результатов, полученных на радиационных химерах, иммунологическое сообщество приняло гипотезу «адаптивной дифференцировки в тимусе» и она в настоящее время присутствует во всех учебниках иммунологии. Конфликтующие данные, полученные на бестимусных мышах, оно было склонно объяснять наличием рудиментов тимуса и «остаточными» процессами дифференцировки и селекции собственных Т-клеток у таких мышей. Следует, однако, отметить, что эти предположения не были подкреплены никакими анатомическими или гистологическими данными.

3. MHC-рестрикция у мышей nude: опыт использования нокаутов по рекомбиназам и аггрегационных химер.

Проблема МНС-рестрикции у мышей nude была подвергнута Цинкернагелем дополнительному углубленному изучению в последние годы, когда стали доступными генетические нокауты по генам рекомбиназ и мыши с экспрессией трансгенных рецепторов, открывающие дополнительные возможности для анализа. Ввиду высокой доказательности таких подходов эти работы заслуживают подробного рассмотрения. В первой серии экспериментов мышей nude F_1 (H-2^b x H-2^d) подвергали сублетальной дозе облучения (4,5 Gy) и трансплантации эмбрионального тимуса H-2^b RAG-1^{0/0} или H-2^d SCID или H-2^d RAG- $1^{0/0}$. По прошествии 12-16 недель этих «восстановленных» мышей иммунизировали LCMV. Тестирование рестрикции СТL на 8-й день после иммунизации показало, что ответ рестриктирован молекулами МНС тимуса и приводит к полной элиминации вируса из печени и селезенки реципиентов. Эти данные подтвердили более ранние результаты и убедительно показали, что «сужение» МНС-рестрикции подсадкой тимусного трансплантата в этом случае не могло быть опосредовано специфическими «супрессорными механизмами», поскольку для восстановления были использованы тимусы иммунодефицитных животных. Во второй серии экспериментов мышей nude гаплотипа H-2^b восстанавливали подсадкой полностью аллогенного тимуса H-2^k RAG-1^{0/0}. Как и в более ранних экспериментах такая схема восстановления приводила к рестрикции CTL молекулами MHC реципиента, а не тимуса и также приводила к элиминации вируса. Параллельно авторы исследовали возможность того, что у радиационных химер может сохраняться некоторое количество выживших гемопоэтических клеток, которые могли влиять на позитивную селекцию. С этой целью вместе с подсадкой аллогенного тимуса H-2^k RAG-1^{0/0} реципиентам дополнительно вводили клетки костного мозга от тех же иммунодефицитных доноров. К их удивлению, результирующая специфичность Т-клеток таких реципиентов (представляющих собой химер, кроветворная система была примерно наполовину представлена клетками и реципиентского и донорского гаплотипа) была рестриктирована молекулами МНС и донора и реципиента, а в некоторых экспериментах - только молекулами МНС донора. Таким образом, авторы пришли к убеждению, что существует альтернативный (если не основной) путь селекиии и созревания Т-клеток, зависимый от клеток, происходящих из костного мозга [49]. В той же работе авторы показали, что экспрессия молекул МНС в трансплантате тимуса, подсадкой которого восстанавливали мышей nude H-2^b, не является необходимым условием для восстановления репертуара Т-клеток. Трансплантация эмбрионального тимуса как от двойных нокаутов по молекулам МНС классов I и II, так и нокаутов по В₂-микроглобулину приводила к формированию нормального ответа СТL на LCMV, рестриктированного по молекулам гаплотипа H-2^b. Что кажется еще более невероятным, полное восстановление ответа достигалось подсадкой тимуса ксеногенных доноров - крыс Lewis. Таким образом, авторы сделали вывод, что *тимус функционирует*, главным образом, как орган, обеспечивающий дифференцировку, реаранжировку генов TCR и его экспрессию. Это предположение было ими проверено в экспериментах с трансгенным TCR318, специфичным к LCMV-GP 33-41 в контексте D^b. Позитивная селекция этого трансгенного рецептора имеет место у мышей с гаплотипом H-2^b, но не H-2^q. Согласно их предположению позитивная селекция и экспансия Т-клеток с уже реаранжированным трансгенным TCR должна иметь место у мышей nude, экспрессирующих молекулу D^b на клетках костномозгового происхождения. Действительно, селективная экспансия Т-клеток CD8⁺, более 90% которых экспрессировали трансген, наблюдалась у мышей nude с гаплотипом $H-2^{b/q}$, но не $H-2^{q/q}$. Соответственно, после инфицирования LCMV, ответ CTL ${\rm CD8}^+$ наблюдался у мышей ${\rm H-2}^{\rm b/q}$, но не ${\rm H-2}^{\rm q/q}$. В целом авторы пришли к выводу, что специфичность Т-клеток отражает экспансию репертуара и жизнеспособность Тклеток на периферии, а также индукцию эффекторов, вызванную молекулами МНС клеток, происходящих из костного мозга.

В последующей блестящей работе 2003 года Мэриэнн Мартиник и Рольфа Цинкернагеля, был использован оригинальный подход, заключающийся в создании агрегационных аллогенных химер восьмиклеточных эмбрионов, один из которых представлял собой гомозиготу nude, а другой – гомозиготу RAG-1^{0/0} или SCID. Были получены химеры SCID H-2^{d} + nude H-2^{b} и $\text{RAG-1}^{0/0}$ H-2^{b} + nude H-2^{d} . У таких мышей эпителий тимуса имеет гаплотип MHC использованного эмбриона SCID или $RAG^{0/0}$, тогда как Т- и В-лимфоциты происходят из клеток эмбриона nude. Было показано, что у таких мышей развивается хорошо смешанный химеризм в разных тканях, который оценивали по экспрессии изоформ глюкозо-6-фосфат изомеразы. Среди лейкоцитов крови клетки CD4⁺, CD8⁺ и B220⁺ имели гаплотип nude, тогда как макрофаги CD11b⁺ были представлены двумя популяциями, экспрессирующими гаплотипы каждого из родителей. Тимусы таких химер подвергли иммуногистологическому анализу и показали, что они имеют нормальный клеточный состав и хорошо развитый эпителий с гаплотипом MHC, полученным от $RAG^{0/0}$. Чтобы исключить наличие рудиментов тимуса, использовали двойное окрашивание на молекулы МНС и цитокератин и методом конфокальной микроскопии показали, что экспрессия молекул МНС класса II родителя $RAG^{0/0}$ и цитокератина имеет место на одних и тех же клетках. Напротив, такое же двойное окрашивание антителами к молекулам МНС nude и цитокератину показало экспрессию молекул МНС класса II с гаплотипом nude, в отсутствие экспрессии цитокератина, что указывало на присутствие в тимусе химер неэпителиальных клеток гематопоэтического происхождения, экспрессирующих МНС родителя nude. Ни у одной из исследованных химер не было обнаружено признаков наличия рудиментов тимуса, состоящих из зрелых эпителиальных клеток с гаплотипом родителя nude. Инфицирование химер вирусом LCMV с последующим анализом ответа CTL на H-2^bи $H-2^d$ -рестриктированные пептиды показало, что *Т-клеточный репертуар агрегационных* химер рестриктирован молекулами МНС обоих родительских гаплотипов. Их ответ был сопоставимым по величине с ответами мышей дикого типа и приводил к полному исчезновению вируса в селезенке и других органах. Чтобы лучше охарактеризовать репертуар эффекторных клеток CD8+, их окрашивали МНС-тетрамерами и показали, что он содержит две неперекрывающиеся популяции, каждая из которых окрашивается либо тетрамером LCMV-GP33 (H- $2D^b$) либо тетрамером LCMV-NP118 (H- $2L^d$). Таким образом, двойная рестрикция репертуара была связана с истинными различиями в рестрикционной специфичности этих субпопуляций, а не с перекрестными реакциями. Не менее интересно то, что у химер, инфицированных вирусами везикулярного стоматита (VSV) и LCMV, развивается эффективный гуморальный IgG-ответ, сравнимый с ответами мышей дикого

типа. Эти ответы выражались в продукции нейтрализующих антител к VSV и нуклеопротеину LCMV, которая строго зависит от когнатной MHC-рестриктированной помощи хелперов CD4⁺. Как уже отмечалось, В-клетки химер экспрессируют МНС родителя Этот факт указывает на то, что хелперы СD4⁺ у агрегационных химер nude. молекулами МНС нетимусного происхождения. рестриктированы расхождения с результатами, полученными на полуаллогенных радиационных химерах, авторы объяснили тем, что облучение не приводит к полной элиминации клеток хозяина, вовлеченных во взаимодействие с ТСР, и, таким образом, приводит к выживанию Т-клеток хозяина, независимо от того, находились ли они в тимусе или на периферии. Поскольку уровень пролиферации в тимусе огромен, такие выжившие хозяйские Т-клетки, уже присутствующие в тимусе облученного реципиента, могут получать большое преимущество в размножении по сравнению с трансплантированными клетками донора, которые должны сначала мигрировать в тимус. Агрегационные химеры являются более предпочтительной моделью именно потому, что с самого начала ставят популяции, развивающиеся на тимусных и нетимусных МНС в равные условия, что позволяет провести их корректное сравнение [50]. Иными словами, ранние результаты, полученные на радиационных химерах, являются следствием экспериментального артефакта, что ставит под состоятельность онтогенетической модели происхождения рестрикции. По всей видимости, она может быть верна лишь в той мере, в какой жизнеспособность и выживание Т-клеток на периферии зависят от экспрессии молекул МНС [51-53]. Общий вывод, который можно сделать из крайне противоречивых результатов, полученных на радиационных и агрегационных химерах, состоит в том, что МНСрестрикция репертуара Т-клеток определяется не столько МНС-гаплотипом эпителия тимуса, сколько гаплотипом клеток костномозгового происхождения (вероятнее всего, профессиональных АПК, презентирующих антигены Т-лимфоцитам— прим. автора).

4. Адаптивная дифференцировка и позитивная селекция: новые подходы.

Основаниями для принятия гипотезы онтогенетического происхождения МНС-рестрикции в свое время стали также наблюдения, показавшие, что некоторые молекулы МНС класса II способны увеличивать частоту зрелых периферических Т-клеток, экспрессирующих отдельные регионы $V\beta$ [54, 55]. Было также показано, что блокада отдельных аллельных продуктов МНС у гибридов F_1 антителами, специфичными к этим аллелям, приводит к подавлению ответов хелперов или СТL, рестриктированных блокированным аллелем [56, 57]. Важно также было то, что отсутствие молекул МНС класса I у подопытных животных отменяет развитие субпопуляции клеток CD8 $^+$, тогда как у животных, лишенных экспрессии молекул МНС класса II, не развиваются клетки CD4 $^+$ [58-61].

Создание животных с трансгенными ТСR могло бы принести убедительные доказательства справедливости этой гипотезы. У таких мышей развивается большое число Т-клеток с рецептором, происходящим из клона с определенной антигенной и рестрикционной специфичностью, появление, свойства и функции которых в разных условиях МНС-окружения легко контролировать. Первые работы по исследованию позитивной селекции трансгенных рецепторов H-Y (со специфичностью к пептиду секс-антигена в контексте H- $2D^b$) [62, 63], 2C (со специфичностью к молекуле $H2-L^d$) [64] и AND (со специфичностью к фрагменту цитохрома с голубя в контексте $I-E^k$) [65, 66] привели к следующему выводу: зрелая T-клетка с трансгенным рецептором развивается, если в организме животного представлен рестриктирующий аллель молекулы MHC в отсутствие специфического пептида. Наиболее четко эта зависимость прослеживается у животных с трансгенным TCR,

специфичным к H-Y антигену. Плоты, показывающие позитивную селекцию клеток $CD8^+$ с этим TCR в тимусе животных $RAG^{0/0}$ с гаплотипом $H-2^{b/d}$ и отсутствие таковой в тимусе $RAG^{0/0}$ с гаплотипом $H-2^{d/d}$, можно встретить во многих учебниках иммунологии как свидетельство прямой взаимосвязи позитивной селекции с MHC-рестрикцией репертуара.

Позднее стало ясно, что такая картина является, мягко говоря, сильно идеализированной. Позитивная селекция клеток CD8⁺ с трансгенным H-Y TCR у мышей H-2^b, как оказалось, сопровождается делецией клеток CD4⁺, несущих тот же рецептор. Причиной этому является способность рецептора реагировать с молекулой A^b , представленной у мышей того же гаплотипа [67]. В работе, исследующей селекцию 2С-ТСК у мышей В6 дикого типа, мутантов по молекуле К и мышей, экспрессирующих исходный аллоантиген L^d, было обнаружено по крайней мере пять различных фенотипических паттернов селекции Т-клеток. Они включали: 1) позитивную селекцию (K^b и K^{bm7}); 2) слабую позитивную селекцию (K^{bm8}); 3) отсутствие позитивной селекции (K^{bm1} и K^{bm10}); 4) негативную селекцию клеток CD8^{hi} (K^{bm3} и K^{bm11}); 5) негативную селекцию всех клеток CD8 (H-2L^d). Эта работа свидетельствует о прямом взаимодействии 2C-TCR с различными аллельными формами молекул МНС в ходе позитивной и негативной селекции [68]. Было также обнаружено, что 2C-TCR помимо иммунизирующего комплекса молекулы L^d с пептидом p2Ca (LSPFPFDL) распознает молекулу Kbm3 с пептидом dEV8 (EQYKFYSV) и позитивно селектирующую молекулу H-2Kb с пептидом SIYR-8 (SIYRYYGL) [69-71]. Распознавание пептидных антигенов этим рецептором является специфическим в контексте аллогенной молекулы L^d , тогда как в контексте позитивно селектирующей молекулы $H-2K^b$ имеет место вырожденное распознавание всех трех пептидов [72]. Более того, его позитивная селекция может иметь место у мышей bm3 $TAP^{0/0}$, т. е. на «пустых» тяжелых цепях молекулы К^{bm3} [73]. Позитивная селекция Т-клеточного рецептора AND может иметь место на разных аллелях МНС [74]. Таким образом, картина получилась прямо противоположной ожидаемой сторонниками гипотезы «адаптивной дифференцировки».

Как отмечают Дайан Матис и Кристоф Бенуа в 11 главе четвертого издания «Фундаментальной иммунологии» Уильяма Пола, результаты работ на животных с трансгенными TCR редко бывают «черно-белыми». В частности, некоторые TCR могут отбираться позитивно иными аллелями МНС, чем рестриктирующий, позитивная селекция других неэффективна даже в присутствии селектирующего аллеля [75], у третьих сужение репертуара в сторону клеток CD4 или CD8 крайне далеко от абсолютного [76, 77]. Одним из интересных примеров таких рецепторов, приведенным в работе Надежды Логуновой и Александра Червонского, может служить TCR MM14.4, который был получен в ответе трансгенных мышей с ограниченным репертуаром презентируемых пептидов на сингенную молекулу МНС класса II I-A^b. При переносе трансгена на генетическую основу мышей C57BL/6 дикого типа Т-клетки с таким рецептором подвергаются делеции вследствие негативной селекции. Хотя рецептор исходно был клонирован из Т-клеточной гибридомы CD4⁺, у мышей, экспрессирующих индивидуальный комплекс молекулы A^b с пептидом E_aцепи AA52-68, позитивно селектируются Т-лимфоциты и CD4⁺ и CD8⁺, причем вторые – с большей эффективностью. У мышей, полностью лишенных экспрессии молекул МНС класса II, Т-лимфоциты CD4⁺ отсутствуют. Соответственно, у трансгенных мышей, лишенных экспрессии молекул МНС класса І, отсутствуют Т-клетки CD8⁺. Позитивная селекция Тклеток CD4⁺ с TCR MM14.4 была обнаружена на трех аллелях молекул MHC класса II – у мышей BALB/c (H-2^d), мутанта по молекуле A^b bm12 и нокаутов по молекуле DM, экспрессирующих комплекс молекулы A^b с пептидом CLIP инвариантной цепи (Ii), что подтверждает вырожденную природу распознавания молекул МНС в ходе позитивной селекции. Более того, у мышей, экспрессирующих ММ14.4, была обнаружена склонность к развитию аутоиммунного дерматита, опосредованного Т-клетками CD8⁺, a in vitro была обнаружена их аллореактивность с аллогенной молекулой H-2K^k [Logunova N., Viret C.,

Pobezinsky L, Miller S., Poon S., Doyle C., Kazansky D., Sundberg J., Chervonsky A. Restricted MHC-peptide repertoire predisposes to autoimmunity. 2004, In press.]

В последнее время на выяснение «специфичности» позитивной селекции были нацелены работы по созданию трансгенных животных, экспрессирующих индивидуальные комплексы молекула МНС/пептид. Суммарный итог этих работ состоит в том, что ограничение репертуара презентируемых пептидов приводит к общему снижению эффективности позитивной селекции и даже презентации эндогенных суперантигенов [78]. Тем не менее, у таких мышей имеет место селекция разнообразного репертуара Тлимфоцитов, способного реагировать на различные аллельные формы молекул МНС [79-82].

Общий вывод, который можно сделать из цитированных работ, состоит в том, что позитивная селекция репертуара является результатом вырожденного распознавания эндогенных комплексов МНС/пептид. Хотя ее эффективность может зависеть от разнообразия пептидов, ассоциированных со «своими» молекулами МНС, она не способна определить рестрикционную специфичность формирующегося репертуара Т-клеток.

5. Аллорестриктированное распознавание – свидетельство в пользу гипотезы «примирования».

Наиболее важный вывод, сделанный сторонниками гипотезы «адаптивной дифференцировки» из ранних экспериментов с полуаллогенными химерами, состоял в том, что МНС-рестрикция является свойством, приобретенным Т-лимфоцитами в ходе антигеннезависимой дифференцировки в тимусе. Согласно их мнению это онтогенетическое событие вызывает такое «сужение» Т-клеточного репертуара, что в ответ на антиген размножаются только клоны, специфичные к антигену в ассоциации с собственными молекулами МНС. Таким образом, данная модель предсказывает, что неиммунная популяция Т-клеток любой линии животных не может распознать антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС. Это прямо противоречит трактовке МНС-рестрикции, предложенной «примирования», предсказывающей гипотезой существование клонов Т-клеток. распознающих антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС. Таким образом, «пробным камнем» в столкновении двух гипотез стал вопрос о том, существует ли аллорестриктированное распознавание, т. е. могут ли Т-лимфоциты, сформированные в одном окружении МНС распознать антигены, представленные на аллогенных АПК?

На этот вопрос было не так просто ответить. Исследователям МНС-рестрикции приходилось тратить немало усилий в борьбе с аллогенными эффектами, поскольку в ответ на индивидуальный антиген вовлечена доля клонов, на 2 порядка меньшая по сравнению с долей клонов, реагирующих на аллогенные молекулы МНС. На заре исследований МНС-рестрикции эту проблему пытались решить, используя метод «фильтрации» или «острого истощения» аллореактивных клеток. Этот метод состоял в том, что Т-клетки вводили облученному аллогенному реципиенту. Аллореактивные Т-лимфоциты попадали в лимфоидные органы реципиента и временно, на двое суток, теряли способность к рециркуляции, тогда как прочие Т-клетки сохраняли способность к миграции и могли быть выделены путем дренирования грудного лимфатического протока [83]. При исследовании специфичности цитотоксических клеток к вирусам осповакцины и гриппа Догерти и Беннинк «фильтровали» клетки мышей $H-2^k$ через облученных мышей F_1 ($H-2^{k/b}$). Популяцию Т-клеток, выделенную отрицательной селекцией стимулировали вирусом у облученных реципиентов F_1 . В результате появлялись СТL, специфичные только к сингенным ($H-2^k$), но

не аллогенным (H-2^b) мишеням, инфицированным вирусом, тогда как у нормальных мышей F₁ появлялись киллеры, специфичные к инфицированным мишеням обоих гаплотипов [84]. Казалось бы, результаты этой работы указывали на то, что МНС-рестрикция является устойчивым свойством, приобретаемым в процессе онтогенеза. Однако последующая работа этих же исследователей показала, что вирус распознается в сочетании с молекулами МНС некоторых гаплотипов и что этот эффект не является следствием кросс-реактивности [85]. Модификации метода «острого истощения» in vitro основывались на абсорбции аллореактивных Т-лимфоцитов на монослоях аллогенных клеток. В работе Губертуса Стокинджера и Германа Вагнера этот подход был дополнен методом лимитирующих разведений, позволяющим количественно анализировать МНС-рестрикцию репертуара на уровне индивидуальных клонов. Исследование рестрикции ответов аллогенных химер на мишени, как модифицированные тринитрофенолом, так и инфицированные вирусом Сендай показало, что в зависимости от использованного протокола иммунизации ответ химер может быть рестриктирован по Н-2 антигенам либо донора стволовых клеток либо тимуса реципиента. Оказалось, что популяции Т-клеток нормальных мышей, из которых устранены аллореактивные клетки, содержат предшественники СТL, способные специфически реагировать как на вирус, так и на дериваты тринитрофенола в контексте аллогенных МНС, которые отсутствовали в процессе внутритимусной дифференцировки. В составе этой истощенной популяции методом лимитирующих разведений авторы проанализировали частоту клонов ауто- и аллорестриктированных CTL. Этот анализ показал, что частота предшественников с сингенной рестрикцией примерно в 6 раз превышает частоту предшественников с аллогенной. При использовании различных комбинаций инбредных линий это превышение варьировало от 2 до 10 раз [35, 36]. Сходные различия были обнаружены теми же авторами среди предшественников CTL тимуса, лишенных аллореактивных клеток и распознающих дериваты тринитрофенола в контексте сингенных и аллогенных молекул МНС [86]. Эти работы были подвергнуты критике Харальдом фон Бёмером и сотрудниками, которые, используя метод острого истощения in vivo, не получили убедительных свидетельств в пользу распознавания минорных антигенов гистосовместимости в контексте аллогенных молекул МНС. У химер F₁(СВА х В6), восстановленных костным мозгом В6, соотношение клонов, распознающих мишени ВАLВ/В $(H-2^b)$ и BALB/К $(H-2^k)$ было 3: 1, тогда как у нормальных мышей B6 оно составляло 17: 1. Авторы также отметили, что у нормальных мышей отмечается заметная кросс-реактивность клонов, распознающих мишени BALB/K, с мишенями BALB/B. Такая кросс-реактивность отмечалась у 25% клонов нормальных мышей и лишь у 1% клонов, выделенных из химер. [34]. Впоследствии Герман Вагнер резонно предположил, что предпочтение репертуара Тлимфоцитов к распознаванию антигенов в контексте «своих» МНС может быть простым следствием экспериментального манипулирования и «поломки» нормального репертуара в процессе формирования химеризма или устранения аллореактивных клеток. Поэтому две последующие работы Йорга Раймана и Германа Вагнера исследовали аллорестриктированных клонов в репертуаре нормальных аллогенных животных. На шести комбинациях аллогенных линий его сотрудниками было показано, что стимуляция предшественников CTL аллогенными клетками, модифицированными тринитрофенолом, выявляет необычайно высокие частоты реагирующих с ними клонов (1/30 – 1/300), многие из которых не реагируют с немодифицированными аллогенными мишенями, т. е. являются аллорестриктированными. [87]. В ответах реципрокных комбинаций респондеров и стимуляторов, выделенных из мышей B6 и bm1, на вирус простого герпеса и дериваты тринитрофенола, было показано, что около 30% клонов, реагирующих на инфицированные либо модифицированные аллогенные мишени, показывают аллорестриктированный паттерн распознавания, т. е. не реагируют на неинфицированные и немодифицированные аллогенные

мишени [88]. В последующей работе Кабелитца и Раймана в ответе на вирус инфекционного паротита было показано существование аллорестриктированных Т-клеток у человека [89].

Исследования аллорестриктированных Т-клеток не ограничились стенами одной лаборатории. Существование клеток, специфически распознающих антигенный пептид в контексте аллогенных молекул МНС, отмечалось неоднократно и другими авторами [70, 90, 91].

Рестрикция ответов таких аллорестриктированных Т-клеток молекулами МНС, которые не представлены в тимусе индивидуума, дала жизнь идее использования её для получения высокоавидных клонов, способных распознавать опухолеассоциированные антигены в организме онкологических больных, экспрессирующих соответствующую молекулу МНС. Действительно, в норме негативная селекция устраняет высокоавидные Тклеточные клоны, способные реагировать с собственными антигенами организма P_1 в контексте собственных молекул МНС $(H-2^x-P_1)$. Но такие клоны, специфичные к $H-2^x-P_1$, присутствуют в организме другого, аллогенного индивидуума Р2, поскольку негативная селекция в его организме приводит к делеции клонов со специфичностью к антигенам, представленным в контексте лишь его собственных (аллогенных организму P_1) MHC (H-2^y-Р₂). Таким образом, используя аллорестриктированное распознавание можно было надеяться получить клоны организма P₂, специфичные к комбинации молекула МНС/пептид H-2^x-P₁ аллогенного реципиента, с тем, чтобы использовать их для адаптивной иммунотерапии. Одним из первых успешных примеров применения аллорестриктированного распознавания опухолеассоциированных антигенов может служить работа Елены Садовниковой и Ганса Стаусса, в которой были получены аллорестриктированные клоны CTL мышей H-2^d, специфичные к комплексу молекулы H-2K^b и пептида протеина mdm-2, гиперэкспрессия которого часто наблюдается в опухолевых клетках. В условиях in vitro такие клоны ууспешно различали нормальные и опухолевые клетки, специфически убивая клетки меланом и лимфом, но не дендритные клетки, экспрессирующие H-2K^b. В условиях in vivo аллорестриктированные клоны замедляли рост меланомы трансплантированных сингенным (H-2^b) реципиентам [92, 93]. Аналогичная работа тех же авторов была нацелена на получение аллорестриктированных клонов, специфичных к пептиду циклина-D₁ в контексте HLA-A2 человека. Полученные клоны успешно убивали клетки рака молочной железы с гиперэкспрессией циклина-D₁, но не клетки лимфобластоидной линии. трансформированной вирусом Эпштейна-Барр Аллорестриктированное распознавание стало эффективным средством преодоления толерантности к опухолеассоциированным антигенам и позволило получить ответы на ряд онкомаркеров, ассоциированных с лейкозами, среди которых транскрипционный фактор WT1, CD68, CD45 [95-97].

В течение последних лет важный вклад в изучение аллорестриктированных клеток был внесен Хансом-Георгом Рамменси с сотрудниками. Имя этого исследователя хорошо известно в связи с рядом более ранних работ, посвященных идентификации МНС-связывающих мотивов в структуре пептидов, взаимодействующих с различными аллельными формами молекул МНС. Методический подход, использованный Райнхардом Обстом, Кристианом Мюнцем и Хансом-Георгом Рамменси заключался в стимуляции репертуара Т-клеток H-2^d смесью синтетических пептидов комбинаторных пептидных библиотек, представляющих собой смеси различных пептидов, синтезированных с учетом МНС-связывающего мотива, который они должны содержать в своей первичной структуре, чтобы успешно связываться с конкретной аллельной формой молекулы МНС (H-2K^b). Для того, чтобы в составе молекул МНС на АПК были представлены только синтетические пептиды, использовали мутантные линии клеток, дефектные в экспрессии транспортеров,

ассоциированных с процессингом (ТАР). Простая инкубация клеток таких линий с пептидами, обладающими оптимальной структурой для связывания, приводит к сборке комплекса молекула МНС/β₂-микроглобулин/пептид и его транспорта на мембрану клетки. Линии аллорестриктированных CTL, полученные в ответе на такие клетки широко различались по пептидной специфичности и авидности - в той же мере, как и линии ауторестриктированных СТL. Авторы заключили, что позитивная селекция в контексте определенной молекулы МНС не требуется для генерации высокоавидных ТСК, рестриктированных той же молекулой, но увеличивает частоту таких CTL. Сходным другой работе авторы проанализировали спектр предшественников аллорестриктированных CTL периферической крови доноров, негативных по HLA-A2 и HLA-A3. Ответ индуцировали TAP-негативными мишенями, экспрессирующими эти молекулы после инкубации с комбинаторными пептидными библиотеками, содержащими мотивы для связывания с этими молекулами МНС. Оказалось, что CTL, специфичные к этим пептидным библиотекам в контексте аллогенных молекул МНС, составляют весьма значительную часть репертуара – примерно половину всех аллореактивных клонов, которые стимулировались в таком ответе. Вместе с тем, частота аллорестриктированных CTL также была в два раза ниже частоты СТL, рестриктированных «своими» молекулами МНС [98, 99]. В последующей работе авторы проанализировали взаимосвязь экспрессии «собственных» молекул МНС с аллореактивным и аллорестриктированным репертуаром, используя сходный методический подход, дополненный тестированием аллорестриктированных ответов на известные вирусные и «собственные» пептиды. Ими было показано, что чем ближе в структурном отношении находится аллогенная молекула МНС и молекула МНС Тклетки, тем выше пропорция аллорестриктированных CTL, специфически распознающих антигенные пептиды и CTL, распознающих аллогенную молекулу вне зависимости от связанного с ней пептида. Это соотношение составляло ~ 1/5 для полностью аллогенной комбинации H-2^d-анти-H-2^b и 1/3 в ответе H-2^{bm1}-анти-H-2^b. Как и следовало ожидать, наиболее высокое соотношение клонов, специфичных к пептиду – 3/1 - обнаруживалась в ответе мутантов молекулы bm13 и bm14, несущих мутации в антигенсвязывающем желобке молекулы H-2D^b, на стимуляторы H-2^b. Обнаруженная закономерность вполне могла быть связана с воздействием позитивной селекции в тимусе и механизмов выживания Т-клеток на периферии на аллореактивный репертуар. Вместе с тем, очевидно, что она не носит характер абсолютного запрета на распознавание пептидов в аллогенном контексте [100]. Недавно прямая визуализация и выделение аллорестриктированных Т-лимфоцитов, специфически распознающих антигенные пептиды, были осуществлены с использованием технологии получения МНС-тетрамеров [101].

Таким образом, безусловно, можно считать доказанным, что Т-клетки могут распознавать антигены в контексте молекул МНС, которые не были представлены в момент дифференцировки в тимусе. Очевидно, что существование феномена «аллорестриктированного распознавания» подтверждается широким экспериментальных данных, далеко выходящих за рамки наблюдений отдельных лабораторий, демонстраций специфичности индивидуальных клонов и пристрастий отдельных исследователей. Более того, аллорестриктированный репертуар Т-клеток по своей широте, разнообразию и способности специфически распознавать индивидуальные пептиды, вполне сопоставим с репертуаром, рестриктированным «своими» молекулами МНС. Само существование Т-клеток, способных распознавать антигены в контексте аллогенных молекул МНС, является весомым доводом, опровергающим гипотезу онтогенетического происхождения МНС-рестрикции. Примечательно то, что позитивная селекция в тимусе и механизмы выживания Тклеток на периферии лишь минимально сужают теоретически возможный спектр

специфичностей Т-лимфоцитов — в гораздо меньшей мере, чем это предполагалось ранее, что делает гипотезу «адаптивной дифференцировки» совершенно непригодной для объяснения четкого экспериментального феномена, открытого Цинкернагелем и Догерти.

6. Молекулярная основа МНС-рестрикции: МНС-связывающие мотивы

В состоянии ли гипотеза «первичного примирования» объяснить неувязки и противоречия экспериментальных данных с гипотезой «адаптивной дифференцировки»? Зависимость рестрикции репертуара от динамики замещения хозяйских АПК клетками донорского происхождения, обнаруженная у радиационных химер [40], и результаты экспериментов по одновременной трансплантации тимуса и костного мозга RAG-нокаутов мышам nude, описанные Цинкернагелем [49], ведут к вполне логичному допущению, что МНС-рестрикция определяется на уровне презентации антигена Т-клеткам. Действительно, все измерения специфических иммунных функций эффекторных клеток, использованные в экспериментах по выяснению происхождения МНС-рестрикции, в той или иной форме требовали предварительного примирования наивных Т-клеток антигеном. А «нетимусными клетками костномозгового происхождения», участвующими в иммунных ответах, являются профессиональные АПК – дендритные клетки, В-лимфоциты и макрофаги. Большие различия в продолжительности жизни этих клеток после летальной дозы облучения, а также различная степень их участия в разных формах иммунного ответа вполне могли стать источником артефактов и противоречий в получаемых экспериментальных данных, а также причиной их неверной интерпретации. С другой стороны, для экспериментальных систем, в которых можно наблюдать значимый первичный ответ наивных Т-клеток, таких как аллогенный ответ или реакция на бактериальные суперантигены, характерно отсутствие МНС-рестрикции.

То, каким образом АПК определяют рестрикцию эффекторных Т-клеток, стало ясным из цикла работ Рамменси и соавторов. Как писал Ханс-Георг Рамменси в своем обзоре, посвященном МНС-связывающим мотивам в структуре пептидов, взаимодействующих с молекулами МНС, иммунологи обязаны этим открытием двум студентам, работавшим на рубеже 80-х и 90-х годов в его лаборатории – Олафу Рётцке и Кирстену Фолку. Оба студента были заинтересованы структурой пептидов, связанных с молекулами МНС класса І. Чтобы получить, молекулы МНС выделяли из клеточных мембран сорбцией на иммуноаффинной колонке, а затем методом кислотной элюции заставляли комплексы молекула МНС/В2-микроглобулин/пептид диссоциировать на составные части. У пептидов, выделенных таким образом, при секвенировании деградацией по Эдману наблюдались четкие сигналы в фиксированных аминокислотных позициях С- и N-концевой части, свидетельствующие о наличии в первичной структуре этих пептидов инвариантных аминокислотных остатков. И что самое важное и интересное, пептиды, связанные с индивидуальными аллельными формами молекул МНС класса I, были гомогенны по размерам, но различались по присутствующим в их структуре мотивам [27, 102, 103]. Эти открытия сразу натолкнули авторов на мысль, что в их руках, возможно, находится мощный аналитический метод, позволяющий из немыслимого разнообразия возможных антигенных пептидов определить именно те, которые будут связываться с определенными аллельными [104]. То, что эти мотивы сформированы "якорными" формами молекул МНС аминокислотными остатками, необходимыми для высокоаффинного связывания пептида с соответствующей молекулой МНС, также означало, что АПК, экспрессирующие различные гаплотипы МНС, будут презентировать разные пептиды одного и того же антигенного белка

[105]. Например, нуклеопротеин вируса гриппа содержит эпитоп, способный связаться с молекулой $H-2K^d$ – в позициях AA147-155 (TYQRTRALV), с молекулой $H-2D^b$ – в позициях AA366-374 (MTEMNENSA). То же самое справедливо и для молекул МНС человека – эпитоп, взаимодействующий с молекулой HLA-A2, находится в позициях AA85-94 (K<u>L</u>GEFYNQ<u>M</u>), с молекулой HLA-A3 – в позициях AA265-273 (I<u>L</u>RGSVAH<u>K</u>), HLA-B8 – в позициях AA380-388 (IAWY<u>R</u>SR<u>L</u>E), HLA-B27 – в позициях AA383-391 (S<u>R</u>YWAIRT<u>R</u>) (подчеркнуты "якорные" остатки, образующие мотивы для связывания). Было показано, что наивысшая аффинность взаимодействия пептидов нуклеопротеина вируса гриппа с молекулой H-2D^b достигается при соответствии структуры пептида выявленному каноническому мотиву [106]. С целью определить, насколько значима роль экспрессии конкретной молекулы МНС для эффективности презентации отдельного пептидного эпитопа, был проведен анализ различий в количестве корректно процессированного K^bрестриктированного эпитопа минорного антигена гистосовместимости Н-4b в клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих молекулу H-2K^b. Выявленные различия составили 3000 раз, что указывает на инструктивную роль молекул МНС в процессинге пептидов. [107]. Выявленные закономерности ассоциации пептидов с молекулами МНС позволили более точно предсказывать структуру Т-клеточных пептидных эпитопов, в том числе, антигенов опухолей. [108-110]. Разработанный авторами подход дал также рациональную основу для поиска молекулярных основ ассоциации аутоиммунных заболеваний с экспрессией определенных гаплотипов МНС [111-113]. Очевидно также, что способность или неспособность продуктов определенных аллелей МНС связываться с пептидами белков патогенных микроорганизмов устанавливает прямую функциональную связь между МНС и генетически детерминированной способностью иммунной системы отвечать на них.

Опыт, полученный при исследовании МНС-связывающих мотивов в структуре MHC, связанных с молекулами сейчас успешно используется комбинаторных пептидных библиотек, конструировании позволяющих позиционное сканирование и выявление высокоаффинных и кросс-реактивных лигандов Тклеточных рецепторов, а также МНС-тетрамеров, используемых для прямой визуализации антигенспецифических Т-лимфоцитов [114, 115]. В Интернете присутствует целый ряд сервисов, позволяющих в режиме on-line сканировать последовательности различных белков с целью выявления потенциальных Т-клеточных эпитопов, презентируемых различными аллельными формами молекул МНС классов I и II мыши и человека. Одним из таких мощных ресурсов, учитывающих, помимо мотивов для связывания, закономерности «резки» молекул на пептиды протеасомой, является RANKPEP [116].

Важно отметить то, что группой Рамменси фактически был открыт молекулярный механизм, способный исчерпывающе объяснить феномен МНС-рестрикции. Действительно, в исходных экспериментах, обнаруживших этот феномен, иммунизация мышей СВА ($H-2^k$) вирусом LCMV должна была привести к индукции СТL, распознающих пептиды вируса, содержащие мотивы для связывания с молекулами МНС $H-2^k$. Понятно, что СТL с такой специфичностью убивали инфицированные клетки L929 или макрофаги ($H-2^k$), презентирующие те же самые пептиды вируса, которые индуцировали ответ у мыши. Конечно, такие СТL не могли убить инфицированные макрофаги гаплотипа $H-2^d$, презентирующие совсем другие пептиды того же вируса. То же самое будет верно и для обратной комбинации. Если мышей гаплотипа $H-2^d$ иммунизировать LCMV, то будут индуцироваться СТL, специфичные к пептидам LCMV, способным связываться с молекулами МНС гаплотипа $H-2^d$. Такие СТL будут лизировать мишени $H-2^d$, презентирующие те же самые вирусные пептиды, но не мишени $H-2^k$, презентирующие другие пептиды (с мотивом для связывания молекул МНС $H-2^k$). Напротив, у мышей $H-2^{k/d}$), экспрессирующих молекулы МНС обоих гаплотипов, иммунизация вирусом приведет к

появлению двух независимых популяций CTL, одна из которых будет лизировать инфицированные мишени гаплотипа $H-2^k$, а другая — $H-2^d$, презентирующие два независимых способных к высокоаффинному антигенных пептидов, соотвествующими молекулами МНС. Формальное подтверждение такой возможности было найдено при анализе иммуногенности трех эпитопов LCMV, рестриктированных молекулой H-2D^b – GP33-41 (KAVYNFATC), GP276-286 (SGVENPGGYCL) и NP396-404 (FQPQNGQFI). Эффективность презентации ЭТИХ пептидов коррелировала c интенсивностью противовирусного ответа СТL. Пептид NP396-404 (содержащий в своей структуре два якорных остатка, составляющих мотив для связывания H-2Db) обладал наиболее высокой протективной активностью, хотя его общее количество в АПК было невелико [117].

Результаты работ, цитированных в этом разделе, указывают на то, что феномен МНС-рестрикции может быть успешно объяснен в терминах гипотезы «первичной иммунизации» и диктуемой ею специфичности эффекторных клеток, активированных в первичном ответе. Молекулярная основа этого феномена состоит в различиях мотивов в первичной структуре пептидов, необходимых для связывания с разными аллельными формами молекул МНС.

7. Природа аллогенного распознавания: прямое и непрямое распознавание

Противоречия и внутренние конфликты в интерпретации современных знаний в иммунологии, порождаемые гипотезой «адаптивной дифференцировки», наиболее ярко проявляются в свете опыта, накопленного в исследованиях аллогенных ответов. Аллогенными называют ответы, развивающиеся на трансплантационные антигены генетически неидентичных животных того же вида. Известные трансплантационные антигены могут быть подразделены на две группы – главные антигены гистосовместимости (классические молекулы МНС, кодируемые комплексом Н-2) и минорные (прочие полиморфные трансплантационные антигены).

Аллогенные молекулы МНС являются самыми важными антигенами, ответственными за отторжение трансплантата. Еще в ранних экспериментах было показано, что кожный трансплантат, отличающийся от реципиента только по антигенам МНС, обычно отторгается за 8-10 дней, тогда как трансплантаты, отличающиеся по какому-либо из минорных антигенов гистосовместимости отторгаются в течение трех или более недель. Аллоантигены МНС также вызывают исключительно интенсивные ответы Т-лимфоцитов в культуре in vitro. Эта интенсивность проявляется, в частности, в способности индуцировать первичные ответы in vitro, тогда как ответы на обычные антигены, например, овальбумин, не обнаруживаются без предварительной иммунизации антигеном. Сила аллогенного иммунного ответа проявляется также в более высокой частоте аллореактивных предшественников по сравнению с клетками, специфичными к антигенам, которые презентируются в ассоциации с собственными молекулами МНС. Частоты аллореактивных Т-клеток могут достигать 2-5% всей популяции Т-клеток, тогда как Т-клетки, реагирующие на растворимые или вирусные антигены, обычно составляют один на 10000 в том же самом пуле Т-клеток [118].

Для объяснения феномена аллореактивности были предложены две модели распознавания аллоантигена Т-клетками. Модель *прямого аллогенного распознавания* предполагает взаимодействие Т-клеточного рецептора прямо с аллогенной молекулой МНС, связанной с пептидом, происходящим из аллогенной АПК. Большинством исследователей предполагается, что этот ответ опосредован миграцией донорских АПК в лимфоидную ткань

реципиента. Эта модель позволяет объяснить тот факт, что аллогенный ответ является МНС-нерестриктированным и способность индуцировать специфический ответ на трансплантат находится под доминантным генетическим контролем аллелей гистосовместимости. Модель непрямого аллогенного распознавания предполагает распознавание Т-клеткой пептида аллогенной молекулы, связанного с молекулой МНС реципиента. Этот путь реализуется в ответах на минорные антигены гистосовместимости и соответствует правилам МНС-рестриктированного распознавания. Как и для прочих МНС-рестриктированных ответов, для него характерен кодоминантный тип наследования. Реализация такого пути возможна в результате презентации аллогенных пептидов, происходящих из клеток трансплантата, дендритными клетками реципиента, захваченными путем эндоцитоза и последующего кросспримирования Т-лимфоцитов реципиента. [119-121].

Очевидно, что гипотеза «адаптивной дифференцировки» находится в согласии лишь со второй моделью, тогда как гипотеза «первичного примирования» - с обеими. Согласно гипотезе «адаптивной дифференцировки» аллогенное распознавание должно быть следствием распознавания пептидов трансплантационных антигенов в контексте собственных молекул МНС отвечающего организма. Прямое взаимодействие с аллогенными молекулами МНС возможно лишь как случайная перекрестная реакция Т-клеточных рецепторов, "обученных" реагировать со "своими" молекулами МНС.

Тем не менее, существуют убедительные свидетельства в пользу того, что оба типа распознавания имеют место в ответах на трансплантат. Детальное исследование соотношения «прямых» и «непрямых» ответов на аллоантигены было проведено Жиллесом Бенишу с использованием метода ELISPOT, позволяющего определить продукцию цитокинов отдельными клетками. В различные временные точки после пересадки полностью аллогенного трансплантата кожи мышей $B10.A (K^k I^k D^d L^d)$ реципиентам $BALB/c (K^d I^d D^d L^d)$ доля индуцированных «непрямых» ответов составляла от 1 до 10%. Преобладание «прямых» ответов (98%) сохранялось и во вторичном ответе, который тестировали через 6 недель после отторжения аллотрансплантата [122]. В аналогичном исследовании «прямых» и «непрямых» ответов клеток CD8⁺, продуцирующих IFNу, частоты Т-клеток, распознающих аллоантиген прямо, были выше в 30-60 раз [123]. То, в какой мере тот или иной тип распознавания будет иметь место, зависит от вида трансплантата, характера антигенных различий и доступности [124, 125]. Как будет показано далее, оценка костимуляторных лигандов АПК эффективности непрямого аллогенного распознавания в цитированных работах могла оказаться завышенной.

По всей видимости, именно безоговорочное принятие гипотезы «адаптивной дифференцировки» послужило причиной множества попыток доказать, что непрямое распознавание является центральным механизмом индукции ответа на трансплантат даже реципиент различаются лишь тогда, донор И ПО главным гистосовместимости и совпадают по минорным. В целом идеологи этого направления признавали четкие свидетельства в пользу доминирования «прямых» ответов. В подтверждение своей концепции авторы ссылались на ряд работ, показавших, что молекулы МНС класса ІІ мыши и человека часто презентируют пептиды, происходящие из белков, вовлеченных в процессинг, в том числе, самих молекул МНС класса II [126-128]. К тому же, в ряде работ был достигнут успех в идентификации пептидов молекул МНС, вовлеченных в непрямое аллогенное распознавание [129-131]. Для демонстрации распознавания» они использовали технику лизиса АПК донора гипотоническим шоком или разрушения ультразвуком и замораживанием/оттаиванием перед их добавлением в MLR, исходя из уверенности, что таким образом «прямой» путь презентации аллоантигена становится невозможным. Используя эту технику, им удалось наблюдать выраженную

пролиферацию Т-лимфоцитов в ответе на лизированные АПК МНС-несовместимых доноров в смешанной культуре лимфоцитов. Однако, этот эффект был хорошо выражен только после предварительной иммунизации реципиентов и не был подкреплен доказательствами, обычно используемыми для подтверждения «непрямого» пути — блокадой антителами к презентирующему аллелю МНС, использованием АПК мышей, дефицитных в экспрессии МНС, или использованием АПК рекомбинантных мышей, экспрессирующих другие презентирующие аллели. Более того, не проводилось фенотипирование пролиферирующих клеток, исходя из уверенности, что в такой MLR а priori пролиферируют клетки CD4⁺. [121].

Для исследования ответов на аллогенные молекулы МНС класса I мы использовали сходную систему, в которой мышей C57BL/10 (H-2^b) иммунизировали клетками мастоцитомы P815 (H-2^d) а рестимуляцию в MLR in vitro проводили через 2 месяца нормальными спленоцитами мышей C57BL/10 (H- 2^b), B10.D2 или BALB/c (H- 2^d) и C3H (H-2^k), убитыми острым тепловым шоком. Первичный пролиферативный ответ на мертвые аллогенные АПК в этой системе отсутствовал, - как и в работах, описанных выше. Как и в описанных работах, мертвые аллогенные АПК вызывали пролиферацию Т-клеток предварительно иммунизированных реципиентов. Но в ответ на иммунизирующий антиген специфически пролиферировали только клетки CD8⁺ иммунных животных. Сходный результат был получен в системе, в которой мышей B10.D2(R101) (H-2^d) иммунизировали клетками тимомы EL4 (H-2^b), а рестимуляцию в MLR in vitro проводили через 2 месяца прогретыми спленоцитами мышей B10.D2(R101), C57BL/6 (H-2^b) и C3H (H-2^k). Нами было показано, что способность пролиферировать в ответ на мертвые аллогенные АПК является не следствием распознавания аллоантигена «непрямым» путем, а специфической особенностью клеток памяти CD8+, примированных аллоантигеном и способных получить костимуляторный сигнал путем транс-костимуляции. Хотя клетки использованных аллогенных опухолей не являются профессиональными АПК, что, казалось бы, предполагает доминирование «непрямого» пути распознавания аллоантигенов клетками CD4⁺, в ответе пролиферировали исключительно клетки CD8⁺. Более того, они эффективно подавляли ответы наивных клеток CD8⁺ in vivo и их вовлечение в пул клеток памяти. Они распознавали иммунизирующий аллоантиген «прямо», поскольку пролиферативный ответ клеток памяти мышей R101 блокировался антителами к молекуле H-2K^b и не развивался, если в качестве стимуляторов в MLR использовали клетки нокаутов по молекулам TAP и β₂-микроглобулина на генетической основе мышей C57BL/6 (H-2^b) [132, 133]. Эти результаты подтверждаются результатами анализа ответов клеток памяти на мутантные молекулы МНС. Распознавание клетками памяти молекулы H-2K^b нарушается как мутацией в пептидсвязывающем регионе (остаток 77 мутанта bm3), так и в регионе, связывающем TCR (остатки 173 и 174 мутанта bm4), но не мутацией в молекуле МНС класса II (остатки 67, 70 и 71 β -цепи молекулы A^b). даже в условиях, благоприятствующих «непрямому» распознаванию аллогенных молекул МНС класса І, в ответе доминируют Т-клетки CD8⁺, распознающие аллоантиген в соответствии с моделью «прямого аллогенного распознавания».

8. Природа прямого аллогенного распознавания: «два сигнала – одна АПК» или «транскостимуляция»?

Эти работы являются далеко не единичными свидетельствами прямого аллогенного распознавания. По всей видимости, первым, кто сумел разделить клетки, прямо распознающие аллогенные молекулы МНС по их специфичности, был Борис Давидович Брондз. Для этого он использовал монослои аллогенных макрофагов [135] Немногим менее

20 лет назад свидетельства о прямом распознавании аллоантигенов были получены в ответе примированных CTL на искусственные мембраны, полученные путем инкубации липида, H-2-антигена и алкилированных частиц двуокиси кремния в дезоксихолате. «искусственные клетки» индуцировали вторичную, но не первичную дифференцировку СТL специфично и не менее эффективно, чем аллогенные клетки. Процессинг антигена в АПК и активация хелперов в таком ответе, по-видимому, не имели места, поскольку ответ полностью зависел от добавления экзогенных цитокинов. [136]. Позднее Мескер и Кейн показали возможность дегрануляции клонированных CTL после взаимодействия с аллоантигеном, сорбированным на пластике [137]. Убедительное доказательство прямого распознавания аллоантигенов, представленных на опухолевых клетках in vivo, было представлено Томасом Маннингом и Дэвидом Кранцем. В попытке определить минимальные требования для индукции CTL они получали мышей, несущих трансгенный 2C-TCR, не генетической основе RAG^{0/0}. У таких мышей все Т-клетки были CD8⁺ и имели одинаковую специфичность к молекуле $H-2L^d$ в отсутствие прочих T- и B-клеток. Трансгенные мыши эффективно отторгали аллогенные клетки P815 (H-2^d), даже введенные в огромном количестве (3 х 10^8), но погибали после трансплантации им сингенной тимомы EL4 (H- 2^b). Блокада костимуляции, опосредованной взаимодействием B7-CD28 путем введения таким животным гибридного белка CTLA-4IgG3 не предотвращала индукцию аллоспецифических CTL и отторжение опухоли. Таким образом, высокая частота предшественников и наличие высокоаффинного аллогенного лиганда для TCR позволяют обойти зависимость ответа от Tхелперов CD4⁺ и костимуляции [138]. Вместе с тем, у животных с нормальным репертуаром Т-клеток отторжение аллогенной опухоли обычно зависит от костимуляции [139]. Тем не менее, устранение взаимодействия двух пар главных костимулирующих лигандов – B7-CD28 и CD40-CD154 (CD40L) - позволяет «увидеть» отторжение кожи, независимое от костимуляции и опосредованное прямым распознаванием аллогенных молекул МНС Тклетками CD8⁺. Такие независимые от костимуляции клетки CD8⁺ индуцируются только в ответе на главные антигены гистосовместимости. Если донор и реципиент отличаются только по минорным антигенам, то блокада этих костимуляторных пар приводит к длительному выживанию кожного аллотрансплантата [140]. Крайзел и Розенгард показали прямое аллогенное распознавание клеток сосудистого эндотелия Т-лимфоцитами CD8⁺, используя в качестве реципиентов радиационных химер, восстановленных костным мозгом мышей $TAP^{0/0}$. У таких животных профессиональные АПК костномозгового происхождения неспособны к кросс-презентации аллоантигенов, что исключает возможность непрямого распознавания. Вместе с тем клетки СD8+ донорского происхождения у таких мышей развиваются нормально и способны к острому отторжению сердечного аллотрансплантата [141, 142].

Клетки CD4⁺ также способны к прямому аллогенному распознаванию молекул MHC. Убедительные доводы в пользу этого были получены в экспериментах, в которых аллогенный трансплантат сердца пересаживали нокаутам по RAG. У таких реципиентов аллогенные трансплантаты сердца успешно приживаются и отторжение отсутствует в течение неопределенного времени. Однако если таким реципиентам ввести очищенные Т-клетки CD4⁺, то имеет место острое отторжение трансплантата. Оказалось, что для острого отторжения аллогенного трансплантата сердца очищенными клетками CD4⁺ необходимы молекулы MHC класса II донора, но не реципиента. Более того, острое отторжение клетками CD4⁺ имеет место в организме реципиентов, нокаутированных и по MHC класса II и по RAG, то есть при полном отсутствии у реципиента собственных Т- и В-клеток, а также молекул MHC, которые могли бы презентировать антиген непрямым путем [143]. Аналогичный результат был получен при трансплантации аллогенного эмбрионального тимусного эпителия, взятого у донора на стадии развития, предшествующей установлению циркуляции кроветворных клеток и поэтому лишенного собственных профессиональных АПК.

Отсутствие молекул МНС класса II у реципиентов не замедляло отторжение таких трансплантатов даже после удаления клеток CD8+ - т. е. в отсутствие всех известных путей активации наивных Т-клеток. [144]. Иные результаты были получены Крайзелом и Розенгардом. Как и в работе, цитированной в предыдущем абзаце, они попытались использовать радиационных химер, восстановленных костным мозгом нокаутов по молекулам МНС класса II, чтобы обнаружить прямое распознавание аллоантигена Тклетками CD4⁺. В отличие от результатов, полученных ранее на клетках CD8⁺, авторы обнаружили неспособность Т-лимфоцитов СD4+ к "прямой" активации аллоантигенами непрофессиональных АПК. Авторы также анализировали отторжение сердечных трансплантатов, выделенных а) из химер мышей В6, восстановленных костным мозгом нокаутов и б) нокаутов, восстановленных костным мозгом мышей Вб. У химер первого типа экспрессия молекул МНС класса II могла иметь место только на клетках сосудистого эндотелия, но не резидентных АПК. У нокаутов второго типа, наоборот, все клетки негемопоэтического происхождения были лишены экспрессии молекул МНС класса II, которые присутствовали лишь на резидентных АПК костномозгового происхождения. Отторжение трансплантатов первого типа было замедленным, тогда как второго типа – быстрым. Это означает, что скорость отторжения сердечного трансплантата критически зависит от прямого распознавания аллогенных молекул МНС класса II, представленных на аллогенных АПК костномозгового происхождения, но не на прочих клетках трансплантата [145].

Таким образом, прямое распознавание аллогенных молекул МНС является детально описанным и доказанным феноменом и доминирует в ответах на полностью аллогенный трансплантат. Полноценная активация Т-клеток CD8⁺ и приобретение ими эффекторных функций могут иметь место в результате прямого распознавания аллогенных молекул МНС на профессиональных и непрофессиональных АПК, тогда как полноценная активация Т-клеток CD4⁺ в результате прямого распознавания аллоантигенов, как правило, имеет место лишь на профессиональных аллогенных АПК.

По всей видимости, эти различия между Т-клетками CD4⁺ и CD8⁺ обусловлены тем, что для активации Т-клеток CD4⁺ необходима коэкспрессия антигенспецифического и костимулирующего лигандов на поверхности одной и той же АПК [146]. Природа этой зависимости состоит в необходимости формирования организованного иммунологического синапса между Т-лимфоцитом и АПК для успешной активации Т-лимфоцита CD4⁺ [147, 148] Зависимость Т-клеток CD8⁺ от презентации антигена профессиональной АПК гораздо менее очевидна, поскольку активация наивных клеток ${\rm CD8}^+$ не требует образования организованного иммунологического синапса И формирования центрального супрамолекулярного активационного кластера [149, 150]. Эти факты допускают возможность существования трехклеточной системы кооперации, в которой Т-клетка СD8⁺ распознает аллогенную молекулу МНС на поверхности непрофессиональной аллогенной АПК, а костимуляторный лиганд – на поверхности дендритной клетки, не участвующей в презентации. Такая модель предлагалась неоднократно по мере накопления фактов, противоречащих догме "два сигнала - одна АПК", а механизм костимуляции, реализованный в ней получил название "транс-костимуляции" [151-154]. Она могла бы объяснить, каким образом индуцируется ответ Т-клеток CD8⁺ на непрофессиональные аллогенные АПК, оставаясь зависимым от костимуляции. По всей видимости, такая модель могла бы объяснить, почему даже фибробласт, трансфецированный генами белков LCMV, становится эффективной АПК, когда попадает в лимфоидную ткань [155, 156].

9. Природа прямого аллогенного распознавания: распознавание пептидов или боковых пепей?

Гипотеза первичного примирования объясняет аллореактивность как следствие врожденного предпочтения Т-клеточных рецепторов к распознаванию молекул МНС вида и/или повышенной плотности (или частоты) антигенных детерминант, презентируемых аллогенными молекулами МНС.

Предположение, что *гены*, кодирующие *TCR*, могут получать предпочтение в эволюции в соответствии со способностью их продуктов взаимодействовать с молекулами *МНС* того же вида впервые было высказано Ephe [15]. Это предполагает, что после устранения аутореактивных клеток в тимусе зрелый репертуар содержит высокие частоты клеток, специфичных ко всем другим антигенам МНС. Поскольку в тимусе отбираются Т-клетки по их способности реагировать с МНС, пул генов ТСR, кодирующий слишком большое число специфичностей, производил бы и большое число "бесполезных" предшественников. Поэтому коррекция пула генов ТСR в сторону образования продуктов, взаимодействующих с МНС, сделала бы тимусную селекцию более эффективной. Ряд свидетельств поддерживают гипотезу Ephe, хотя эффективность селекции Т-клеток в тимусе, по-видимому, очень низка [157, 158].

Вторая гипотеза, называемая гипотезой *«плотности детерминант»* предполагает различия в экспрессии обычных антигенов, презентируемых «своими» МНС на «своих» АПК и экспрессии аллогенных молекул МНС на аллогенных АПК [159]. В соответствии с ней плотность антигенных детерминант, экспрессируемых «своей» АПК, является очень низкой, поскольку большинство молекул МНС презентируют пептиды, не имеющие отношения к аллоантигену, тогда как плотность детерминант на аллогенной АПК очень высока. Согласно этой гипотезе высокой частоты аллореактивных клеток в реальности не существует, а аллогенные АПК активируют большое число Т-клеток благодаря более сильному стимулу, вовлекающему в ответ Т-клетки с относительно низкоаффинными рецепторами. Очевидными недостатками этой гипотезы являются: 1) отсутствие каких-либо убедительных данных о вовлечении в аллогенный ответ клонов с низкоаффинными рецепторами; 2) отсутствие свидетельств о положительной корреляции между интенсивностью аллогенного ответа и эффективностью презентации каких-либо пептидов; 3) гипотеза не объясняет, почему Т-клеточные рецепторы распознают антигены в контексте молекул МНС.

Третье объяснение феномена аллореактивности, называемое гипотезой *«частоты детерминант»* было разработано на основе идеи о том, что Т-клетки, специфичные к аллоантигенам МНС, зависят от пептидов, презентируемых этими молекулами. Молекулы МНС реципиента презентируют пептиды собственных белков, к которым у реципиента развивается толерантность. Такая аутотолерантность не затрагивает ответ на пептиды, презентируемые аллогенными АПК. Эта гипотеза предполагает, что аллореактивные клетки действительно присутствуют у реципиента в большом количестве, поскольку каждый аллоантиген МНС создает большое разнообразие антигенных детерминант [160]. Серьезным доводом в пользу этой гипотезы является идентификация различий в МНС-связывающих мотивах пептидов, взаимодействующих с различными аллельными формами молекул МНС. Очевидно, что эти различия приводят к презентации аллогенной клеткой широчайшего спектра комплексов пептидов с аллогенными МНС, ни один из которых не представлен на АПК отвечающего организма. Очевидным недостатком этой гипотезы является то, что она также не в состоянии объяснить распознавание антигенов в контексте молекул МНС.

Выбор между двумя последними гипотезами зависит от степени, в которой аллореактивные Т-клетки зависят от пептидов, презентируемых аллогенными молекулами МНС. Есть свидетельства, подтверждающие, что аллореактивные Т-клетки могут распознавать детерминанты, не зависящие от связанного пептида [161, 162]. Тем не менее, большинство свидетельств указывает на то, что пептиднезависимое распознавание является относительно редким событием, что аллореактивные клетки действительно распознают аллогенные молекулы МНС в ассоциации с пептидами, часто с высокой специфичностью [91, 102, 163]. Зависимость аллореактивных Т-клеток памяти CD8⁺ от пептидов, связанных с аллогенными молекулами МНС, была выявлена и нами. Клетки памяти CD8+ мышей B10.D2(R101) ($K^{d}I^{d}D^{b}$), полученные в ответе на клетки тимомы EL4 ($K^{b}D^{b}$), пролиферируют в MLR в ответе на аллогенные стимуляторы мышей C57BL/6 (K^bD^b) дикого типа. подвергнутые острому тепловому шоку. Пролиферация отсутствует, если в качестве стимуляторов использовать клетки нокаутов по молекулам ТАР. Это свидетельствует о зависимости прямого распознавания молекулы $H-2K^b$ на поверхности аллогенной АПК от пептидов связанных с этой молекулой [133] Интересные и убедительные данные о роли пептидов в аллореактивности были получены в системе "single MHC/peptide", использующей трансгенных мышей pEa, все молекулы MHC класса II которых представлены индивидуальным комплексом молекулы A^b с пептидом AA 52-68 молекулы Eα, а также мышей DM-KO, у которых молекулы класса II связаны с индивидуальным пептидом CLIP, происходящим из инвариантной цепи (Ii). Эта работа привела к ряду интересных и важных характеризующих механизмы аллогенного И аллорестриктированного распознавания. Во-первых, оба лиганда оказались «плохими» стимуляторами аллогенного ответа, что свидетельствует в пользу гипотезы «частоты детерминант» и подчеркивает важность презентации разнообразного репертуара пептидов для индукции интенсивного аллогенного ответа. Во вторых, Т-клеточные гибридомы, полученные в аллогенном ответе на (аллорестриктированные), характеризовались комплексы чувствительностью к стимуляции антигенным пептидом и более вырожденным его распознаванием по сравнению с гибридомами, полученными в ответе сингенных животных (ауторестриктированными). В-третьих, тестирование более 500 аллореактивных гибридом показало, что большинство аллореактивных Т-клеток являются зависимыми от пептида, но лишь 17% гибридом распознают его специфично. Авторы предположили, что влияние пептидов на аллогенные ответы может состоять в индукции слабых изменений в конформации а-спиралей молекулы МНС, которые распознаются аллореактивными Тклеточными рецепторами. Вырожденное распознавание пептида и высокая чувствительность к пептидному лиганду являются двумя главными свойствами аллореактивных Т-клеток, которые вносят существенный вклад в силу аллогенных ответов. [164]. Таким образом, аллогенный ответ является зависимым от пептидов, связанных с аллогенными молекулами МНС, и значительный процент клонов, активированных аллогенными молекулами МНС, распознает эти пептиды специфично. Это указывает на сходство взаимодействия аллореактивных и ауторестриктированных Т-клеток с их лигандами -МНС/пептидными комплексами.

Боковые α -спирали молекул МНС тоже взаимодействуют с TCR, что может иметь важное значение в проявлении феномена аллореактивности. Цитотоксические Т-лимфоциты способны лизировать аллогенные клетки мишени, лишенные TAP и поэтому экспрессирующие лишь небольшое количество «пустых» тяжелых цепей молекул МНС класса I на поверхности клетки. Более того, у мышей bm3 с нокаутированным геном TAP клетки CD8 $^+$ образуются в тимусе и в больших количествах накапливаются в периферических лимфоидных органах, что свидетельствует о возможности прохождения позитивной селекции на этой молекуле в отсутствие связанных с ней пептидов [73]. Группой

Сингера было показано, что аллогенное распознавание молекулы H-2K^b цитотоксическими Т-лимфоцитами может быть подавлено пептидом той же молекулы АА163-174, что свидетельствует о существовании региона для связывания тяжелой цепи молекулы МНС с TCR [165, 166]. Пептиды из С-концевых участков α-спиралей, не содержащие мотивов для связывания с молекулами МНС реципиентов B10.D2(R101), тем не менее, вызывают клеточно-опосредованную супрессию аллогенного иммунного ответа и даже продление жизни аллогенного трансплантата кожи после внутривенного введения реципиентам [167]. Ряд доказательств взаимодействия TCR с остатками молекул МНС был получен с использованием мутантных молекул МНС. Некоторые точечные мутации в боковых аспиралях молекул МНС не оказывают влияния на спектр связанных с ними пептидов, но, тем не менее, вызывают интенсивный аллогенный ответ [168, 169]. Исчерпывающий анализ молекулы H-2K^d был проведен группой Марики Пла. Было показано, что мутации в позициях 62, 65, 69, 72, 152, 163, 166 α-спиралей, локализованные вне пептидсвязывающего желобка, могут быть антигенными. Авторы проанализировали репертуар пептидов, которые связывались с индивидуальными мутантными молекулами и не обнаружили никакой корреляции между пептидами, презентируемыми мутантами и способностью мутантов вызывать первичный аллогенный ответ [170]. Были также предприняты попытки определить конкретные аминокислотные остатки, вовлеченные в распознавание молекул МНС класса І аллореактивными и ауторестриктированными СТL. С использованием больших панелей ауторестриктированных и аллореактивных клонов и мишеней, экспрессирующих мутантные с измененными остатками. было показано, что их распознавание аллореактивными и ауторестриктированными клонами зависит от одних и тех же остатков тяжелых цепей, формирующих общие паттерны распознавания [171, 172]. Картирование относительных энергий взаимодействия TCR с остатками тяжелой цепи молекулы MHC с использованием аланинового мутагенеза показало, что около 2/3 поверхности и энергии взаимодействий в интерфейсе между TCR и молекулой МНС принадлежит взаимодействию рецептора с тяжелой цепью молекулы гистосовместимости класса І [173]. Эти данные свидетельствуют о том, что феномен аллореактивности не может быть полностью объяснен одними лишь различиями в репертуаре пептидов, презентируемых различными молекулами МНС. Не менее важную роль играют остатки боковых остиралей, способные к прямому взаимодействию с ТСК.

Молекулы МНС презентируют Т-клеткам пептиды как собственных белков организма, так и чужеродных. Желобок МНС с пептидом направлен в сторону межклеточного пространства и представляет собой относительно плоскую поверхность, сформированную α-спиралями молекулы МНС и пептидом. На сегодняшний день известны кристаллические структуры нескольких комплексов ТСР/МНС/пептид. взаимодействия между этими молекулами, в основном, совпадает. Т-клеточный рецептор ориентирован по диагонали относительно внешней поверхности комплекса пептид/МНС. В пространственной структуре контакта TCR/MHC/пептид петли CDR1 и CDR2 α-цепи TCR располагаются около N-концевой части пептида, тогда как сходные участки В-цепи находятся около С-концевой части пептида. В основном, петли CDR1 и CDR2, кодируемые V-регионом, взаимодействуют с аминокислотными остатками молекул МНС. Наибольшей вариабельностью обладает третий регион ТСР, определяющий комплементарность взаимодействия с молекулой MHC - CDR3. Регионы CDR3 альфа- и бета-цепей TCR ориентированы по центру контакта (ТСК/МНС/пептид) и, в основном, взаимодействуют с центральной частью пептидной цепи. Несколько аминокислотных остатков пептида формируют внешнюю поверхность комплекса молекула МНС-пептид и, таким образом, доступны для взаимодействия с TCR. По этой причине наиболее вариабельные регионы CDR3α и CDR3β цепи молекулы TCR обладают наилучшим доступом к наиболее

вариабельной части лиганда - пептиду [174]. Сходный принцип организации взаимодействия TCR/MHC оказался у аллоспецифического TCR Bm3.3, взаимодействующего с молекулой МНС класса I H-2K^b, связанной с естественно процессированным октапептидом (рВМ1: INFDFNTI). Особенностью этого комплекса является то, что взаимодействие данных TCR и пептида, связанного с молекулой MHC, обусловлено практически только регионом CDR 3β, тогда как в других комбинациях МНС и TCR остатки α- и β-цепей обычно вносят эквивалентный вклад во взаимодействие. В соответствии с этим лишь несколько аминокислотных остатков на С-конце пептида оказались вовлечены во взаимодействие с рецептором. Второй особенностью этой комбинации оказалась очень малая площадь интерфейса между взаимодействующими TCR и MHC – наименьшая из всех известных. несмотря на то, что аффинность взаимодействия, определенная методом поверхностного плазменного волнового резонанаса, оказалась высокой – на верхней границе ранга известных значений. Регион CDR3α этого рецептора велик, состоит из 11 аминокислотных остатков, смещен в сторону от пептид-связывающего желобка и взаимодействует лишь с остатком Gln^{65} α -спирали домена α_1 молекулы MHC, тогда как CDR3 β – состоит из 9 аминокислотных остатков и полностью опосредует взаимодействие с пептидом. Соответственно, CDR1 а и CDR2α оказываются смещенными к N-концу α-спирали домена α₂ молекулы MHC в сторону от области связывания пептида, что препятствует их взаимодействию с с-спиралями молекулы MHC. Иными словами, положение TCR, связанного с лигандом, оказывается «скособоченным» и обусловленным, в основном, взаимодействиями с остатками VВ-цепи рецептора с боковой цепью молекулы МНС и С-концевой частью пептида. Такие особенности взаимодействия могут лежать в основе вырожденности распознавания пептидов в аллогенном ответе. Для частной комбинации TCR/MHC/пептид разнообразие пептидов, которые могли бы успешно участвовать во взаимодействии с TCR Bm3.3, возросло бы в 400 [175]. Данные рентгеноструктурного анализа являются самым ярким подтверждением прямого взаимодействия ТСК с аллогенной молекулой МНС. Они не выявили принципиальных отличий аллореактивных и ауторестриктированных ТСК в топологии их взаимодействия с МНС/пептидными комплексами. Различия в длине регионов CDR3 у TCR Вт3.3 дают структурные основания для объяснения причин вырожденности распознавания им пептидного лиганда.

Вместе с тем накапливаются данные, свидетельствующие о том, что вырожденное распознавание комплексов молекула МНС/пептид Т-клеточными рецепторами является общей особенностью любых Т-клеточных рецепторов. Действительно, когда проводится детальный анализ кросс-реактивности известных индивидуальных ТСR, он обычно приводит к выявлению дополнительных молекул МНС или пептидных лигандов, способных к взаимодействию с ними. Это хорошо иллюстрируют примеры, описанные в части 4 обзора. Кросс-реактивность обнаружилась и у полученного нами аллореактивного клона клеток памяти CD8 $^+$ МСС-1, полученного в ответе на аллогенную молекулу H-2K b . Помимо иммунизирующего антигена он способен активироваться в ответе на H-2D d (L d) и H-2D d (L d). Вместе с тем его ТСR не имеет существенных различий в длине CDR3-регионов α - и β -цепи [133]. По всей видимости, вырожденность распознавания является важной чертой механизма иммунного ответа, позволяющей Т-клеткам эффективно распознать огромное количество потенциальных пептидных последовательностей, связанных с молекулами МНС, со специфичностью достаточной для того, чтобы отличить "свое" от "чужого". [114, 176].

Спектр представленных работ позволяет сделать вывод о том, что принципиальных отличий между распознаванием пептида в контексте сингенной и аллогенной молекулами МНС не существует. Оба типа взаимодействия способны индуцировать высокоспецифичный иммунный ответ на индивидуальные комплексы

молекула МНС/пептид и оба типа могут проявлять неразборчивость в распознавании комбинаций других молекул МНС с другими пептидами. Вместе с тем, для ответа на аллогенные комплексы молекул МНС с пептидами характерно вовлечение заметной доли клонов, распознающих эти комплексы вырожденно, что может проявляться в их кросс-реактивности и преимущественном взаимодействии с боковыми α-спиралями молекул МНС. Наиболее вероятной причиной появления таких «неразборчивых» клонов является то, что их не затрагивает негативная селекция.

10. Возврат к гипотезе Ерне.

полагать, что способность репертуара Т-рецепторов Есть ЛИ основания взаимодействовать с МНС предопределена генетически? Двумя независимыми группами исследователей показано, что в тимусе неселектированный репертуар Т-клеточных рецепторов обладает врожденной способностью к распознаванию молекул МНС [157, 177]. Первая группа показала, что более 20% тимоцитов до прохождения позитивной и негативной селекции способны распознавать молекулы МНС. Авторы основывались на том, что на клетках, распознавших молекулы МНС, индуцируется экспрессия поверхностного активационного маркера CD69 [177]. Другая группа исследователей в качестве модели использовала Т-клетки из тимусов мышей, которые лишены экспрессии молекул МНС. Такие клетки представляют собой DP лимфоциты, имеющие репертуар рецепторов, не прошедший ни позитивную, ни негативную селекцию на молекулах МНС. Как и у нормальных мышей, эти клетки не являются зрелыми. С помощью моноклональных антител к молекулам TCRα/β и CD4 в органных культурах тимуса (FTOC) авторы эффективно индуцировали созревание таких тимоцитов. Анализ специфичности TCR этих клеток показал высокую частоту клонов. реагирующих c аллогенными молекулами преселектированном репертуаре Т лимфоцитов (такую же, как и в репертуаре после прохождения селекции). Этот факт говорит о врожденной предрасположенности TCR к взаимодействию с молекулами МНС. Эволюция сформировала гены TCR так (в особенности CDR1 и CDR2 районы V-сегментов), что их продукты предпочтительно взаимодействуют с боковыми α-спиралями молекул МНС [157].

Эти результаты способны до основания потрясти привычную картину мира, сложившуюся в сознании иммунологов. Ведь они означают, что: 1) предпочтение во взаимодействии TCR с MHC не является следствием позитивной селекции в тимусе; 2) репертуар Т-лимфоцитов исходно и заведомо специфичен ко всем вариантам классических молекул МНС вида, что предполагает коэволюцию трех независимых генетических локусов $(\alpha/\delta, \beta \text{ и MHC}); 3)$ аллореактивность и MHC-рестрикция могут являться прямыми следствиями такой врожденной специфичности. Поэтому работа Янга и Стаусса 2002 г. стала логическим продолжением этих работ. В этой работе авторы оценивали способность четырех комбинаций пептидов с молекулой H-2K^b индуцировать ауто- и аллорестриктированные ответы у трех различных линий мышей. Респондеры примировали in vitro стимуляторами, нагруженными пептидами и затем методом лимитирующих разведений анализировали частоты CTL, специфичных к пептидам. Три пептида из четырех индуцировали ответы, рестриктированные своими МНС лучше, чем чужими, но различия были небольшими – частоты различались лишь в 3-5 раз. Четвертый пептид индуцировал ауто- и аллорестриктированные CTL с одинаковой эффективностью. Титрование пептидов показало, что высокоавидные CTL присутствовали в панелях и ауто- и аллорестриктированных CTL. Эти данные позволили авторам заключить, что сужение репертуара в сторону предпочтительного распознавания антигенов в контексте собственных МНС,

предполагаемое позитивной селекцией в тимусе, является лишь минимальным. Дополнительный анализ зрелых Т-клеток, полученных из тимуса мышей, дефицитных в экспрессии молекул МНС, после искусственной стимуляции лектином показал, что K^b -рестриктированные СТL обнаруживаются среди таких Т-клеток в количествах, сходных с аллорестриктированными СТL. Таким образом, **МНС-рестриктированное распознавание** пептидов является врожденным свойством, внутренне присущим репертуару Т-клеток и не требует тимусной селекции молекулами МНС. [178].

В этом свете самым интересным является вопрос о том, каковы структурные основания для такой генетической предрасположенности. Главной особенностью продуктов главного комплекса гистосовместимости (МНС) является исключительный внутривидовой полиморфизм, который, как полагают, имеет целью презентацию максимально возможного числа потенциальных патогенных пептидов. Домены α_1 и α_2 молекул МНС класса I плацентарных млекопитающих, участвующие в связывании антигенных пептидов и взаимодействии с TCR, строго совпадают по длине и в гомологичных позициях содержат 30% аминокислотных остатков, которые являются либо инвариантными либо представлены «молчащими» заменами. Значительная вариабельность (шесть и более вариантов замен) обнаруживается лишь в 38 позициях аминокислотных остатков из 179. Но локализация лишь 9 из них указывает на возможность влияния на связывание пептида, тогда как 16 находятся в позициях, способных влиять на связывание с ТСР [Д. Б. Казанский, Л. А. Побезинский, Т. С. Терещенко. Мотивы в первичной структуре молекул МНС класса I и их использование для создания синтетических лигандов Т-клеточных рецепторов. 2004, Вестник РАМН, в печати]. Тем не менее, число возможных гаплотипов МНС в реальной популяции может исчисляться сотнями. Генам, кодирующим Va и VB-сегменты Т-клеточного рецептора, такой обширный полиморфизм не свойственен. Субсемейства генов TCRV, обнаруженные у мыши и человека, имеют высокое сиквенсное сходство. Оно более выражено у гомологичных пар генов одного субсемейства у разных видов, чем у членов различных субсемейств, что указывает на трансвидовую эволюцию генов TCR [179, 180]. Эти факты указывают на то, что, несмотря на разнообразие, создаваемое реаранжировкой генов ТСР, и множественность гаплотипов МНС, взаимодействие TCR с молекулами МНС может быть генетически детерминировано и опосредовано консервативными взаимодействиями их структур. Функционально это выражается в том, что в процессе аллогенного ответа зачастую наблюдается сужение репертуара активированных Т-клеток, несущих TCR с определенными вариантами Va и Vβ [181-184]. Это же имеет место и в ходе тимусной селекции. варианты Va «предпочитают» Определенные взаимодействовать класса МНС. Т-клетки, несущие такие TCRVα предпочтительно определенного дифференцируются в клетки CD8⁺ (реактивные к молекулам МНС класса I) либо в CD4⁺ (реактивные к молекулам МНС класса II). Такое врожденное свойство определяется районами CDR1 и CDR2 цепи Va и точечные мутации в этих районах способны поменять дифференцировку клеток с $CD4^+$ на $CD8^+$ [185-187].

Важно отметить, что гипотеза о генетической предрасположенности репертуара к распознаванию молекул гистосовместимости, была предложена Ерне еще в 1971 г. Согласно ей "специфичность антител определяется структурными V-генами, которые кодируют аминокислотные последовательности вариабельных регионов полипептидных цепей антител. Гипотеза предполагает, что стволовая клетка животного несет набор V-генов, определяющих активные сайты антител, направленных против полного набора антигенов гистосовместимости вида, к которому относится животное. Гипотеза устанавливает существование двух популяций антигенчувствительных клеток. Одна из популяций состоит из клеток, продуцирующих антитела против посторонних антигенов; эти лимфоциты

возникают как мутанты клонов, экспрессирующих V-гены субпопуляции S, кодирующих антитела против антигенов гистосовместимости индивидуума. Другая популяция состит из лимфоцитов, отторгающих аллотрансплантат, которые экспрессирует прочие V-гены субпопуляции А, кодирующей антитела против антигенов гистосовместимости вида, отсутствующих у индивидуума. При этом первичные лимфоидные органы служат для разведения таких мутантов. В тимусе пролиферация лимфоцитов, экспрессирующих V-гены популяции S и последующая супрессия этих запрещенных клонов ведет к селекции мутантных клеток, экспрессирующих V-гены, которые модифицированы спонтанными соматическими мутациями. Этот процесс создает как толерантность к «своему», так и антигенчувствительных клеток, отражающее разнообразие разнообразие лимфоцитов, экспрессирующих субпопуляции Пролиферация V-гены создает антигенчувствительные клетки, которые ответственны за аллоагрессию."

Несмотря на то, что этой гипотезе уже более 30 лет, ее актуальность в наши дни поражает.

11. Несколько спорных вопросов или «Что происходит на самом деле?»

По всей видимости, критическая масса фактов, которые не укладываются в гипотезу онтогенетического происхождения МНС-рестрикции, давно преодолена. Экспериментальные подходы, на которых она первично была основана, подверглись серьезной критике самого первооткрывателя МНС-рестрикции. Факты, полученные в ее поддержку при использовании животных с трансгенными ТСР, не прошли проверку временем и фактически опровергнуты. Почти осознано то, что рестрикционная специфичность Т-клеток определяется гаплотипом не тимусного эпителия, а клеток костномозгового происхождения с некоторым вкладом эффектов микроокружения и выживания на периферии. По всей видимости, этот идейный «дрейф» имеет целью альтернативную гипотезу происхождения МНС-рестрикции – гипотезу «первичного примирования», согласно которой рестрикционная специфичность Тлимфоцитов является свойством не всего репертуара Т-клеток, а лишь той его части, которая была примирована в первичном иммунном ответе на определенную комбинацию МНС/пептид. Иными словами, эта специфичность диктуется антигенпрезентирующей клеткой костномозгового происхождения. Попытки ограничить эту специфичность «воспитанием» на индивидуальных комплексах молекул МНС с пептидами в тимусе приводили к формированию разнообразного репертуара Т-клеток, способных реагировать на молекулы MHC. Идентификация мотивов в структуре взаимодействующих с молекулами МНС, дала достаточную молекулярную основу, чтобы происхождение МНС-рестрикции в терминах гипотезы «первичного объяснить примирования». Созданные на основе этого открытия комбинаторные пептидные библиотеки дали убедительные доказательства существования обширного репертуара аллорестриктированных Т-клеток и обнаружили весьма незначительное влияние позитивной селекции на сужение репертуара в сторону ауторестриктированных клонов. Учитывая то, что гипотеза «адаптивной дифференцировки» прямо отрицает возможность существования аллорестриктированных ответов и прямого аллогенного распознавания, которое, как оказалось в реальности, сильно доминирует в ответах на аллотрансплантаты, то пришло время признать, что роль гипотезы онтогенетического происхождения МНСрестрикции, присутствующей во всех современных учебниках иммунологии, стала дезориентирующей.

Феномен аллореактивности эта гипотеза пытается объяснить в терминах кроссреактивности со "своим". Сторонникам "кросс-реактивного" толкования природы

аллогенных ответов можно было бы задать вопрос, часто ли они наблюдают перекрестные реакции, значительно превышающие специфическую по интенсивности? Ответ, по всей видимости, будет отрицательным. Здравый смысл подсказывает, что "на самом деле всё специфической является реакция репертуара наоборот" на трансплантационные антигены, тогда как распознавание обычных пептидных антигенов в контексте собственных молекул МНС организма является «кроссреактивным». Это предполагает, что в репертуаре исходно заложена специфичность ко всем аллельным продуктам МНС вида и репертуар до селекции способен распознать любой такой продукт как чужеродный. Негативная селекция устраняет из репертуара клоны, специфичные к «своему» и оставляет все прочие, в числе которых будут присутствовать и ауторестриктированные и аллорестриктированные и кроссреактивные (в чужом МНС-окружении). При встрече с «модифицированным своим» пептидом или пептидом эндогенного мутантного презентированным собственной молекулой МНС, - начинает отвечать часть клонов, которые исходно обладают специфичностью к аллогенным молекулам МНС. Такой ответ является перекрестной реакцией репертуара на пептид патогена + своя молекула МНС. Это предполагает, что генетический полиморфизм молекул МНС вида является отражением (возможно, неполным) спектра специфичностей Т-клеточных рецепторов. этом свете негативная селекиия призвана адаптировать преселектированный мономорфный репертуар Т-клеток к индивидуальному окружению трансплантационных антигенов конкретного индивидуума с тем, чтобы избежать с ним трансплантационного конфликта. Неизбежным отрицательным последствием негативной селекции будет утрата некоторых специфичностей, которые могли бы оказаться полезными в ответах на патогены. Такая утрата создает у индивидуума «ахиллесову пяту», которая тут же становится объектом атаки быстро **Эволюционирующих** патогенных микроорганизмов злокачественно трансформированных клеток. В силу того, что молекулы МНС чрезвычайно полиморфны и их отдельные аллельные формы презентируют различные пептиды одних и тех же белков, такая «ахиллесова пята» будет иметь индивидуальный характер у каждой особи вида. Поэтому селекция вариантов вируса по способности избежать иммунной атаки у одного индивидуума не защитит его от устранения иммунной системой другого хозяина. Таким образом, полиморфизм МНС создает своего «страховочную сеть», позволяющую медленно эволюционирующим видам позвоночных животных избежать уничтожения быстро эволюционирующими патогенными микроорганизмами.

Традиционно иммунологи рассматривают свойства иммунной системы в контексте ее коэволюции с патогенными микроорганизмами. Если исходить из этой идеи, то полиморфизм молекул МНС должен был бы выражаться в вариабельности лишь тех аминокислотных остатков, которые влияют на презентацию пептидов патогенных микроорганизмов. Однако в реальности это не так и значительная часть вариабельных остатков находится в положениях, определяющих связывание с ТСR, не влияющих на специфичность связывания пептидов и, тем не менее, придающих молекулам МНС аллоантигенные свойства. Смысл такого полиморфизма совершенно непонятен, если исходить из традиционных представлений об антигенпрезентирующей функции МНС. Но его можно понять, если исходить из предлагаемой гипотезы, в центре которой стоят именно аллоантигенные свойства молекул МНС. Ведь изменение аллоантигенного «образа» молекулы изменит и характер негативной селекции репертуара, а значит даст дополнительную возможность отдельным особям вида сохранить полезные клоны, способные ответить на патоген. Действительно, в нашей недавней работе мы пытались оценить вариабельность индивидуальных аминокислотных остатков молекул МНС класса I

млекопитающих. Эта работа быстро привела к выявлению мотивов в структуре этих молекул и спектра аминокислотных замен, которые могут присутствовать в каждой отдельной позиции. И что интересно, она быстро привела к исчерпанию пределов вариабельности аминокислотных остатков, формирующих groove молекулы. То есть каждая новая независимая молекула, добавляемая в базу данных, уже не приводила к увеличению их числа. Для этой группы остатков вероятность их несоответствия выявленному мотиву составила лишь 0,9%, тогда как для остатков, взаимодействующих с ТСР, она оказалась в пять раз выше - 4,3%. Иными словами, эволюция уже исчерпала возможности вариаций остатков, формирующих groove, но она продолжается в интерфейсе взаимодействия TCR с [Д.Б.Казанский. Мотивы в первичной структуре молекул МНС функций. 2003, http://kazansky1.narod.ru/ связь структуры И works/motifs.pdf]. Этот факт также трудно объяснить, не учитывая способности TCR к прямому взаимодействию с молекулами МНС, их аллоантигенных свойств и влияния на репертуар.

По-видимому, важное достоинство предложенной гипотезы состоит в том, что она дает возможность примирить опыт, накопленный в иммунологии трансплантации, с концепцией МНС-рестрикции и дать разумное объяснение феномену аллореактивности. Необходимость такого примирения диктуется тем, что носителем этих свойств является один и тот же «субстрат» – взаимодействие репертуара с молекулами гистосовместимости. В рамках гипотезы адаптивной дифференцировки аллореактивность совершенно непонятным и не укладывающимся в рамки стройной концепции. Даже генетический контроль аллогенных реакций и МНС-рестриктированного распознавания оказался различным. Способность индуцировать специфический аллогенный ответ наследуется как доминантный признак, тогда как способность к индукции МНСрестриктированных ответов - как кодоминантный. Аллогенные эффекты в свое время крови исследователям МНС-рестриктированного распознавания испортили немало чужеродных антигенов. Чтобы его «увидеть» потребовались генетически чистые линии животных и особая тщательность в разработке экспериментальных схем. Поэтому стремление «уйти» от аллогенных эффектов и не касаться их интерпретации было в свое время вполне оправданным. Очевидно, что ситуация стала иной в результате открытия аллорестриктированного распознавания и получения многочисленных экспериментальных свидетельств в его поддержку. Гипотеза, предложенная Ерне, разрешила загадку доминантного наследования аллоантигенности предсуществованием способности репертуара распознавать трансплантационные антигены, что заложено в самой структуре V-генов. Поразительно точное предвидение Ерне нашло прямое экспериментальное подтверждение в работе Церрана и Руле. Открытие закономерностей презентации пептидов молекулами МНС показало, что спектры пептидов, которые презентируют аллельные формы молекул МНС, различаются. Важность презентации широкого репертуара пептидов для развития интенсивного аллогенного ответа была показана в работе Ковалика и ван Каера. Таким образом, сегодня в свете предложенной гипотезы можно утверждать, что высокая интенсивность аллогенного ответа объясняется двумя, не исключающими друг друга генетически особенностями Т-клеточного распознавания: 1) обусловленной способностью репертуара к взаимодействию со всем спектром молекул МНС вида; 2) селекции, сохраняющей способность репертуара специфичностью негативной ответить на пептиды, презентируемые в контексте аллогенных молекул МНС.

Очевидно, что первая и, возможно, наиболее важная задача, которая стоит перед иммунной системой — это задача разрешить трансплантационный конфликт с самой собой и не разрушить организм, в котором она развивается. Ведь здравый смысл подсказывает, что рецепторы адаптивного иммунитета «видят» собственные антигены организма неизмеримо

чаще антигенов патогенных микроорганизмов. Это означает, что способность к МНСрестриктированному распознаванию формировалась не столько в борьбе с патогенными микроорганизмами, сколько в предотвращении реакций на "свое". На этом пути ограничение числа мишеней иммунных реакций несколькими типами распознаваемых молекул было бы полезным, поскольку избавило бы от опасности другие биологические макромолекулы. Классические молекулы МНС позволили сфокусировать эти реакции на коротких пептидах, содержащих аминокислотные замены, не представленные в отвечающем организме. Вместе с тем они дали возможность для эффективного формирования специфической центральной толерантности к своему, не вовлекая в этот процесс огромное разнообразие конформационных эпитопов других белковых молекул. Поэтому аллореактивность может быть не просто обратной стороной эффективности индукции центральной толерантности, но и главной ключевой особенностью Т-клеточного репертуара. Более того, эта особенность взаимодействия с собственными и чужеродными трансплантационными антигенами может быть фундаментом, на котором строится адаптивный Т-клеточный иммунитет. Отчасти это находит подтверждение в наблюдении, что толерантность к «своему» является МНСрестриктированной. Клон СТL 27.В2, полученный в ответе мышей bm1 на стимуляторы В6, распознает один и тот же пептид в контексте аллогенной молекулы H-2K^b, но не сингенной молекулы H-2K^{bm1} [168]. Это соображение подкрепляется также сходством генетического контроля МНС-рестрикции и толерантности к «своему», наследование которых имеет кодоминантный характер.

Обычное возражение сторонников гипотезы адаптивной дифференцировки, которое часто приходится слышать, состоит в том, что аллореактивность является искусственным лабораторным феноменом, которого в природе не существует, как не существует и трансплантации. Тем не менее, в реакции тимоцитов на собственные МНС можно найти много черт сходства с реакцией зрелого репертуара на трансплантационные антигены. Оба типа реакций зависят от одних и тех же костимулирующих лигандов и корецепторов [188, 189]. Оба типа показывают зависимость от авидности взаимодействий Т-клеток с АПК, хотя, по всей видимости, тимоциты имеют более низкий порог активации по сравнению зо зрелыми периферическими Т-клетками [190, 191]. Позитивная селекция, очевидно, может быть аналогом периферических взаимодействий Т-клеток с собственными МНС. необходимыми для их выживания [192]. Негативная селекция в тимусе имеет явное сходство с периферической делецией Т-клеток в ответ на высокоаффинное связывание с эндогенными суперантигенами [193]. Существенное различие состоит лишь в том, что эффективное взаимодействие тимоцитов с собственными молекулами МНС в тимусе приводит к их делеции, тогда как реакция зрелых Т-клеток на аллоантигены – к приобретению эффекторных функций [194]. Таким образом, тимусная селекция может рассматриваться как аллогенная реакция пре-селектированного репертуара на собственные трансплантационные антигены, которая протекает в течение всей жизни организма. Этот процесс, очевидно, решает две главные задачи: 1) устранить аутоиммунные и кросс-реактивные (неразборчивые) клоны, реагирующие с собственными трансплантационными антигенами; 2) сохранить возможно наиболее широкий репертуар специфичностей ко всем потенциальным патогенам, с которыми может встретиться организм. Первая задача решается путем негативной селекции в тимусе, устраняющей высокоаффинные к «своему» и кросс-реактивные клоны. Вторая – путем сохранения остальной части репертуара Т-клеток путем слабого вырожденного взаимодействия с собственными трансплантационными антигенами. В силу того, что репертуар специфичен ко всему спектру продуктов МНС вида, эта оставшаяся часть репертуара будет содержать клоны «кросс-реактивные» и «аутоиммунные» в ином окружении МНС. В этом свете становится понятным происхождение кросс-реактивных клонов, повышенные частоты

которых имеют место в аллогенном ответе. Становится ясной и причина вырожденности распознавания посторонних антигенов и аллельных продуктов МНС рецепторами Т-клеток. При врожденной специфичности репертуара ко всем трансплантационным антигенам вида эта вырожденность, по всей видимости, необходима для сохранения широкого спектра специфичности репертуара к патогенам, которые организм еще не встречал.

Главная задача этого обзора состояла в том, чтобы выявить внутренние конфликты, которые существуют в современных представлениях об МНС-рестрикции и аллогенном распознавании и по возможности предложить разумную альтернативу, которая наилучшим образом примиряла бы существующие проотиворечия и конфликты точек зрения. Ведь наличие хорошей теории это необходимое условие правильной постановки задач в будущем, не повторяя ошибок прошлого.

Автор считает своим долгом отметить, что отдельные положения высказанной гипотезы содержатся в целом ряде работ, инициированных идеей Ерне, а затем открытием Йенса Церрана и Давида Руле [15, 192, 195-198].

12. Благодарности

Я выражаю свою глубокую признательность академику Г.И.Абелеву и профессору А.В.Червонскому, дискуссии с которыми побудили меня написать этот обзор. Я от всей души благодарю профессора Рольфа Цинкернагеля, снабдившего меня некоторыми важными ссылками и статьями. Работа по распознаванию молекул МНС клетками памяти в лаборатории автора поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований №-05-04-49793 и №-04-04-49187.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. Restriction of invitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic chorio-meningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature, 1974, V. 248, P. 701-702.
- 2. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. Cytotoxic thymus-derived lymphocytes in cerebrospinal fluid of mice with lymphocytic choriomeningitis. J. Exp. Med., 1973, V. 138, N. 5, P. 1266-1269.
- 3. Oldstone M.B., Dixon F.J., Mitchell G.F., McDevitt H.O. Histocompatibility-linked genetic control of disease susceptibility. Murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. J. Exp. Med., 1973, V. 137, N. 5, P. 1201-1212.
- 4. Gorer P.A. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. J. Pathol. Bacteriol., 1937, V. 44, P. 691-697.
- 5. Snell G.D. Methods for the study of histocompatibility antigens. J. Genet., 1948, V. 49, P. 87-108.
- 6. Dausset J. Iso-leuko-antibodies. Acta Haematol. 1958, V. 20, P. 156-166.
- 7. Van Rood J. J., Van Leeuwen A. Leukocyte grouping. A method and its application. J. Clin. Invest. 1963, V. 42, N. 9, P. 1382–1390.

- 8. Levine B.B., Ojeda A.A., Benacerraf B. Studies on artificial antigens. III. The genetic control of the immune response to hapten-poly-L-lysine conjugates in guinea pigs. J. Exp. Med., 1963, V. 118, P. 953-957.
- 9. McDevitt H.O., Sela M. Genetic control of the antibody response. I. Demonstration of determinant-specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. J. Exp. Med., 1965, V. 122, N. 3, P. 517-531.
- 10. McDevitt H.O., Chinitz A. Genetic control of the antibody response: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. Science, 1969, V. 163, N. 872, P. 1207-1208.
- 11. Lilly F., Boyse E.A., Old L.J. Genetic basis of susceptibility to viral leukaemogenesis. Lancet, 1964, V. 14, P. 1207-1209.
- 12. Burnet F.M. Multiple polymorphism in relation to histocompatibility antigens. Nature. 1973, V. 245, N. 5425, P. 359-361.
- 13. Bodmer W.F. Evolutionary significance of the HL-A system. Nature, 1972, V. 237, N. 5351, P. 139-145.
- 14. Benacerraf B., McDevitt H.O. Histocompatibility-linked immune response genes. Science. 1972, V. 175, N. 19, P. 273-279.
- 15. Jerne N.K. The somatic generation of immune recognition. Eur. J. Immunol. 1971, V. 1, N.1, P. 1-9.
- 16. Lawrence H.S. Homograft sensitivity. An expression of the immunologic origins and consequences of individuality. Physiol. Rev., 1959, V. 39, P. 811-859.
- 17. Shearer G.M. Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes. Eur. J. Immunol., 1974, V. 4, N. 8, P. 527-533.
- 18. Blanden R.V., Doherty P.C., Dunlop M.B., Gardner I.D., Zinkernagel R.M., David C.S. Genes required for cytotoxicity against virus-infected target cells in K and D regions of H-2 complex. Nature, 1975, V. 254, N. 5497, P. 269-270.
- 19. Koszinowski U., Ertl H. Lysis mediated by T cells and restricted by H-2 antigen of target cells infected with vaccinia virus. Nature, 1975, V. 255, N. 5509, P. 552-554.
- 20. Gordon R.D., Simpson E., Samelson L.E. In vitro cell-mediated immune responses to the male specific (H-Y) antigen in mice. J. Exp. Med., 1975, V. 142, N. 5, P. 1108-1120.
- 21. Bevan M.J. The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. J. Exp. Med., 1975, V. 142, N. 6, P. 1349-1364.
- 22. Doherty P.C., Zinkernagel R.M. A biological role for the major histocompatibility antigens. Lancet, 1975, V. 1, N. 7922, P. 1406-1409.
- 23. Babbitt B.P., Allen P.M., Matsueda G., Haber E., Unanue E.R. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. Nature, 1985, V. 317, P. 6035, V. 359-361.
- 24. Buus S., Colon S., Smith C., Freed J.H., Miles C., Grey H.M. Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1986, V. 83, N. 11, P. 3968-3971.

- 25. Townsend A.R., Rothbard J., Gotch F.M., Bahadur G., Wraith D., McMichael A.J. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. Cell, 1986, V. 44, N. 6, P. 959-968.
- 26. Maryanski J.L., Pala P., Corradin G., Jordan B.R., Cerottini J.C. H-2-restricted cytolytic T cells specific for HLA can recognize a synthetic HLA peptide. Nature, 1986, V. 324, N. 6097, P. 578-579.
- 27. Falk K., Rotzschke O., Rammensee H.G. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. Nature, 1990, V. 348, N. 6298, P. 248-251.
- 28. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature, 1987, V. 329, N. 6139, P. 512-518.
- 29. Garcia K. C., Degano M., Stanfield R. L., Brunmark A., Jackson M. R., Peterson P. A., Teyton L., Wilson A. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. Science. 1996. V. 274. P. 209-219.
- 30. Paul W. E. Fundamental immunology. 1984, New York, Raven Press.
- 31. Katz D. H. The role of histocompatibility complex in lymphocyte differentiation. Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol., 1977, V. 41, P. 611-624.
- 32. Bevan M. J., In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. Nature, 1977, V. 269, P. 417-418.
- 33. Zinkernagel R. M., Klein P. A., Klein J. Hostdetermined T-cell fine specificity for self H-2 in radiation bone-marrow chimaera of C57BL/6 (H-2^b), mutant Hz1 (H-2^{ba}), and F₁ mice. Immunogenetics, 1978, V. 7, P. 73-77.
- 34. Teh H.S., Bennink J., Von Boehmer H. Selection of the T cell repertoire during ontogeny: limiting dilution analysis. Eur J Immunol., 1982, V. 12, N. 10, P. 887-892.
- 35. Stockinger H., Pfizenmaier K., Hardt C., Rodt H., Rollinghoff M., Wagner H. H-2 restriction as a consequence of intentional priming: T cells of fully allogeneic chimeric mice as well as of normal mice respond to foreign antigens in the context of H-2 determinants not encountered on thymic epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1980, V. 77, N. 12, P. 7390-7394.
- 36. Wagner H., Hardt C., Bartlett R., Stockinger H., Rollinghoff M., Rodt H., Pfizenmaier K. Frequency analysis of cytotoxic T lymphocyte precursors in chimeric mice. Evidence for intrathymic maturation of clonally distinct self-major histocompatibility complex- and allo-major histocompatibility complex-restricted virus-specific T cells. J. Exp. Med., 1981, V. 153. N. 6, P. 1517-1532.
- 37. Blanden R.V., Andrew M.E. Primary anti-viral cytotoxic T cell response in semiallogeneic chimeras are not absolutely restricted to host H-2 type. J. Exp. Med., 1979, V. 149, P. 535-538.
- 38. Zinkernagel R.M., Callahan G.N., Klein J., Dennert G. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. Nature, 1978, V. 271., P. 251-253.
- 39. Zinkernagel R.M., Callahan G.N., Althage A., Cooper S., Klein P.A., Klein J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition? J. Exp. Med., 1978, V. 147, P. 882-896.

- 40 Longo D.L., Schwartz R.H. T-cell specificity for H-2 and Ir gene phenotype correlates with the phenotype of thymic antigen-presenting cells. Nature, 1980, V. 287, N. 5777, P. 44-46.
- 41. Bix M., Raulet D. Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. Nature, 1992, V. 359, N. 6393, P. 330-333.
- 42. Hugo P., Kappler J.W., McCormack J.E., Marrack P. Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1993, V. 90, N. 21, P. 10335-10339.
- 43. Takahama Y., Suzuki H., Katz K.S., Grusby M.J., Singer A. Positive selection of CD4⁺ T cells by TCR ligation without aggregation even in the absence of MHC. Nature, 1994, V. 371, N. 6492, P. 67-70.
- 44. Matzinger P., Mirkwood G. In a fully H-2 incompatible chimera, T cells of donor origin can respond to minor histocompatibility antigens in association with either donor or host H-2 type. J. Exp. Med., 1978, V. 148, N. 1, P. 84-92.
- 45. Wagner H., Rollinghoff M., Rodt H., Thierfelder S. T cell-mediated cytotoxic immune responsiveness of chimeric mice bearing a thymus graft fully allogeneic to the graft of lymphoid stem cells. Eur. J. Immunol., 1980, V. 10, N. 7, P. 521-525.
- 46. Zinkernagel R.M., Althage A., Waterfield E., Kindred B., Welsh R.M., Callahan G., Pincetl P. Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts. J. Exp. Med., 1980, V. 151, N. 2, P. 376-399.
- 47. Singer A. Experimentation and thymic selection. J. Immunol., 1988, V. 140, N. 8, P. 2481-2483
- 48. Matzinger P. Why positive selection? Immunol. Rev., 1993, V. 135, P. 81-117.
- 49. Zinkernagel R.M., Althage A. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, V. 96, P. 8092-8097.
- 50. Martinic M.M., Rulicke T., Althage A., Odermatt B., Hochli M., Lamarre A., Dumrese T., Speiser D.E., Kyburz D., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2003, V. 100, N. 4, P. 1861-1866.
- 51. Tanchot C., Lemonnier F.A., Perarnau B., Freitas A.A., Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. Science, 1997, V. 276, N. 5321, P. 2057-2062.
- 52. Kirberg J., Berns A., von Boehmer H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. J. Exp. Med., 1997, V. 186, N. 8, P. 1269-1275.
- 53. Rooke R., Waltzinger C., Benoist C., Mathis D. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. Immunity, 1997, V. 7, N. 1, P. 123-134.
- 54. MacDonald H.R., Lees R.K., Schneider R., Zinkernagel R.M., Hengartner H. Positive selection of CD4⁺ thymocytes controlled by MHC class II gene products. Nature, 1988, V. 336, P. 471-473.

- 55. Blackman M.A., Marrack P., Kappler J. Influence of the major histocompatibility complex on positive thymic selection of V beta 17a+ T cells. Science, 1989, V. 244, P. 214-217.
- 56. Marrack P., Kushnir E., Born W., McDuffie M., Kappler J. The development of helper T cell precursors in mouse thymus. J. Immunol., 1988, V. 140, P. 2508-2514.
- 57. Marusic-Galesic S., Longo D.L., Kruisbeek A.M. Preferential differentiation of T cell receptor specificities based on the MHC glycoproteins encountered during development. Evidence for positive selection. J. Exp. Med., 1989, V. 169, P. 1619-1630.
- 58. Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H., Jaenisch R. β₂-microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells. Nature, 1990, V. 344, P. 742-746.
- 59. Koller B.H., Marrack P., Kappler J.W., Smithies O. Normal development of mice deficient in $\beta_2 M$, MHC class I proteins, and CD8⁺ T cells. Science, 1990, V. 248, P. 1227-1229.
- 60. Cosgrove D., Gray D., Dierich A., Kaufman J., Lemeur M., Benoist C., Mathis D. Mice lacking MHC class II molecules. Cell, 1991, V. 66, P. 1051-1066.
- 61. Grusby M.J., Johnson R.S., Papaioannou V.E., Glimcher L.H. Depletion of CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. Science, 1991, V. 253, P. 1417-1420.
- 62. Teh H.S., Kisielow P., Scott B., Kishi H., Uematsu Y., Bluthmann H., von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. Nature, 1988, V. 335, P. 229-233.
- 63. Kisielow P., Teh H.S., Bluthmann H., von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. Nature, 1988, V. 335, P. 730-733.
- 64. Sha W.C., Nelson C.A., Newberry R.D., Kranz D.M., Russell J.H., Loh D.Y. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. Nature, 1988, V. 336, P. 73-76.
- 65. Berg L.J., Pullen A.M., Fazekas de St. Groth B., Mathis D., Benoist C., Davis M.M. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. Cell, 1989, V. 58, P. 1035-1046.
- 66. Kaye J., Hsu M.L., Sauron M.E., Jameson S.C., Gascoigne N.R., Hedrick S.M. Selective development of CD4⁺ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. Nature, 1989, V. 341, P. 746-749.
- 67. Arsov I., Vukmanovic S. Dual MHC class I and class II restriction of a single T cell receptor: distinct modes of tolerance induction by two classes of autoantigens. J. Immunol., 1999, V. 162, N. 4, P. 2008-2015.
- 68. Sha W.C., Nelson C.A., Newberry R.D., Pullen J.K., Pease L.R., Russell J.H., Loh D.Y. Positive selection of transgenic receptor-bearing thymocytes by K^b antigen is altered by K^b mutations that involve peptide binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, V. 87, P. 6186-6190.
- 69. Tallquist M.D., Yun T.J., Pease L.R. A single T cell receptor recognizes structurally distinct MHC/peptide complexes with high specificity. J. Exp. Med., 1996, V. 184, N. 3, P. 1017-1026.

- 70. Udaka K., Tsomides T.J., Eisen H.N. A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in association with a class I MHC protein. Cell, 1992, V. 69, N. 6, P. 989-998.
- 71. Udaka K., Wiesmuller K.H., Kienle S., Jung G., Walden P. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. J. Immunol., 1996, V. 157, N. 2, P. 670-678.
- 72. Tallquist M.D., Weaver A.J., Pease L.R. Degenerate recognition of alloantigenic peptides on a positive-selecting class I molecule. J. Immunol., 1998, V. 160, N. 2, P. 802-809.
- 73. Kuhns S.T., Tallquist M.D., Johnson A.J., Mendez-Fernandez Y., Pease L.R. T cell receptor interactions with class I heavy-chain influence T cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2000, V. 97, N. 2, P. 756-760.
- 74. Kaye J., Vasquez N.J., Hedrick S.M.. Involvement of the same region of the T cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. J. Immunol., 1992, V. 148, P. 3342-3353.
- 75. Bogen B., Gleditsch L., Weiss S., Dembic Z.. Weak positive selection of transgenic T cell receptor-bearing thymocytes: Importance of major histocompatibility complex class II, T cell receptor and CD4 surface molecule densities. Eur. J. Immunol., 1992, V. 22, P. 703-709.
- 76. Kirberg J., Baron A., Jakob S., Rolink A., Karjalainen K., von Boehmer H.. Thymic selection of CD8⁺ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. J. Exp. Med., 1994, V. 180, P. 25-34.
- 77. Matechak E.O., Killeen N., Hedrick S.M., Fowlkes B.J. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. Immunity, 1996, V. 4, P. 337-347.
- 78. Golovkina T., Agafonova Y., Kazansky D., Chervonsky A. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. J. Immunol., 2001, V. 166, N. 4, P. 2244-2250.
- 79. Ignatowicz L., Kappler J., Marrack P. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. Cell, 1996, V. 84, N. 4, P. 521-529.
- 80. Ignatowicz L., Rees W., Pacholczyk R., Ignatowicz H., Kushnir E., Kappler J., Marrack P. T cells can be activated by peptides that are unrelated in sequence to their selecting peptide. Immunity, 1997, V. 7, N. 2, P. 179-186.
- 81. Chmielowski B., Muranski P., Ignatowicz L. In the normal repertoire of CD4⁺ T cells, a single class II MHC/peptide complex positively selects TCRs with various antigen specificities. J. Immunol., 1999, V. 162, N. 1, P. 95-105.
- 82. Lee D.S., Ahn C., Ernst B., Sprent J., Surh C.D. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: Autoreactive T cells are low-affinity cells. Immunity, 1999, V. 10, P. 83-92.
- 83. Heber-Katz E., Wilson D.B. Collaboration of allogeneic T and B lymphocytes in the primary antibody response to sheep erythrocytes in vitro. J. Exp. Med., 1975, V. 142, P. 928-935.
- 84. Bennink J.C., Doherty P.C. T cell populations specifically depleted of alloreactive potential cannot be induced to lyse H-2 different virus-infected target cells. J. Exp. Med., 1978, V. 148, P. 128-135.

- 85. Doherty P.C., Bennink J.C. Vaccinia-specific cytotoxic T-cell responses in the context of H-2 antigens not encountered in thymus may reflect aberrant recognition of a virus-H-2 complex. J. Exp. Med., 1979, V. 149, N. 1, P. 150-157.
- 86. Stockinger H., Bartlett R., Pfizenmaier K., Rollinghoff M., Wagner H. H-2 Restriction as a consequence of intentional priming: frequency analysis of alloantigen-restricted trinitrophenyl-specific cytotoxic T lymphocyte precursors within thymocytes of normal mice. J. Exp. Med., 1981, V. 153, P. 1629-1639.
- 87. Reimann J., Heeg K., Miller R.G., Wagner H. Alloreactive cytotoxic T cells. I. Alloreactive and allorestricted cytotoxic T cells. Eur. J. Immunol., 1985, V. 15, N. 4, P. 387-393.
- 88. Reimann J., Kabelitz D., Heeg K., Wagner H. Allorestricted cytotoxic T cells. Large numbers of allo-H-2K^b-restricted antihapten and antiviral cytotoxic T cell populations clonally develop in vitro from murine splenic precursor T cells. J. Exp. Med., 1985, V. 162, N. 2, P. 592-606.
- 89. Kabelitz D., Herzog W.R., Heeg K., Wagner H., Reimann J. Human cytotoxic T lymphocytes. III. Large numbers of peripheral blood T cells clonally develop into allorestricted anti-viral cytotoxic T cell populations in vitro. J. Mol. Cell. Immunol., 1987, V. 3, N. 1, P. 49-60.
- 90. Heath W.R., Hurd M.E., Carbone F.R., Sherman L.A. Peptide-dependent recognition of H-2K^b by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. Nature, 1989, V. 341, N. 6244, P. 749-752.
- 91. Alexander-Miller M.A., Burke K., Koszinowski U.H., Hansen T.H., Connolly J.M. Alloreactive cytotoxic T lymphocytes generated in the presence of viral-derived peptides show exquisite peptide and MHC specificity. J. Immunol., 1993, V. 151, N. 1, P. 1-10.
- 92. Sadovnikova E., Stauss H.J. Peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by nonself major histocompatibility complex class I molecules: reagents for tumor immunotherapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1996, V. 93, N. 23, P. 13114-13118.
- 93. Stanislawski T., Voss R.H., Lotz C., Sadovnikova E., Willemsen R.A., Kuball J., Ruppert T., Bolhuis R.L., Melief C.J., Huber C., Stauss H.J., Theobald M. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. Nat. Immunol., 2001, V. 2, N. 10, P. 962-970.
- 94. Sadovnikova E., Jopling L.A., Soo K.S., Stauss H.J. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. Eur. J. Immunol., 1998, V. 28, N. 1, P. 193-200.
- 95. Gao L., Bellantuono I., Elsasser A., Marley S.B., Gordon M.Y., Goldman J.M., Stauss H.J. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. Blood, 2000, V. 95, N. 7, P. 2198-2203.
- 96. Sadovnikova E., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G., Zabotina T., Stauss H.J. The CD68 protein as a potential target for leukaemia-reactive CTL. Leukemia, 2002, V. 16, N. 10, P. 2019-2026.
- 97. Amrolia P.J., Reid S.D., Gao L., Schultheis B., Dotti G., Brenner M.K., Melo J.V., Goldman J.M., Stauss H.J. Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. Blood, 2003, V. 101, N. 3, P. 1007-1014.
- 98. Obst R., Munz C., Stevanovic S., Rammensee H.G. Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire. Eur. J. Immunol., 1998, V. 28, N. 8, P. 2432-2443.

- 99. Munz C., Obst R., Osen W., Stevanovic S., Rammensee HG. Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. J. Immunol., 1999, V. 162, N. 1, P. 25-34.
- 100. Obst R., Netuschil N., Klopfer K., Stevanovic S., Rammensee H.G. The role of peptides in T cell alloreactivity is determined by self-major histocompatibility complex molecules. J. Exp. Med., 2000, V. 191, N. 5, P. 805-812.
- 101. Moris A., Teichgraber V., Gauthier L., Buhring H.J., Rammensee H.G. Cutting edge: characterization of allorestricted and peptide-selective alloreactive T cells using HLA-tetramer selection. J. Immunol., 2001, V. 166, N. 8, P. 4818-4821.
- 102. Rotzschke O., Falk K., Deres K., Schild H., Norda M., Metzger J., Jung G., Rammensee H.G. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. Nature, 1990, V. 348, N. 6298, P. 252-254.
- 103. Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S., Jung G., Rammensee H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature, 1991, V. 351, N. 6324, P. 290-296.
- 104. Falk K., Rotzschke O., Deres K., Metzger J., Jung G., Rammensee H.G. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. J. Exp. Med., 1991, V. 174, N. 2, P. 425-434.
- 105. Rammensee H.G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. Curr. Opin. Immunol., 1995, V. 7, N. 1, P. 85-96.
- 106. Cerundolo V., Elliott T., Elvin J., Bastin J., Rammensee H.G., Townsend A. The binding affinity and dissociation rates of peptides for class I major histocompatibility complex molecules. Eur. J. Immunol., 1991, V. 21, N. 9, P. 2069-2075.
- 107. Wallny H.J., Rotzschke O., Falk K., Hammerling G., Rammensee H.G. Gene transfer experiments imply instructive role of major histocompatibility complex class I molecules in cellular peptide processing. Eur. J. Immunol., 1992, V. 22, N. 3, P. 655-659.
- 108. Rotzschke O., Falk K., Stevanovic S., Jung G., Walden P., Rammensee H.G. Exact prediction of a natural T cell epitope. Eur. J. Immunol., 1991, V. 21, N. 11, P. 2891-2894.
- 109. Wallny H.J., Deres K., Faath S., Jung G., Van Pel A., Boon T., Rammensee H.G. Identification and quantification of a naturally presented peptide as recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for an immunogenic tumor variant. Int. Immunol., 1992, V. 4, N. 10, P. 1085-1090.
- 110. Rammensee H.G., Falk K., Rotzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. Annu. Rev. Immunol., 1993, V. 11, P. 213-244.
- 111. Vartdal F., Johansen B.H., Friede T., Thorpe C.J., Stevanovic S., Eriksen J.E., Sletten K., Thorsby E., Rammensee H.G., Sollid L.M. The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ (alpha 1* 0501, beta 1* 0201) molecule. Eur. J. Immunol., 1996, V. 26, N. 11, P. 2764-2772.
- 112. Kalbus M., Fleckenstein B.T., Offenhausser M., Bluggel M., Melms A., Meyer H.E., Rammensee H.G., Martin R., Jung G., Sommer N. Ligand motif of the autoimmune disease-associated mouse MHC class II molecule H2-A(s). Eur. J. Immunol., 2001, V. 31, N. 2, P. 551-562.

- 113. Munz C., Hofmann M., Yoshida K., Moustakas A.K., Kikutani H., Stevanovic S., Papadopoulos G.K., Rammensee H.G. Peptide analysis, stability studies, and structural modeling explain contradictory peptide motifs and unique properties of the NOD mouse MHC class II molecule H2-A^{g7}. Eur. J. Immunol., 2002, V. 32, N. 8, P. 2105-2116.
- 114. Wilson D.B., Wilson D.H., Schroder K., Pinilla C., Blondelle S., Houghten R.A., Garcia K.C. Specificity and degeneracy of T cells. Mol. Immunol., 2004, V. 40, P. 1047-1055.
- 115. Xu X.N., Screaton G.R. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. J. Immunol., Methods., 2002, V. 268, N. 1, P. 21-28.
- 116. Reche P.A., Glutting J.P., Zhang H., Reinherz E.L. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. Immunogenetics, 2004, V. 56, N. 6, P. 405-419.
- 117. Gallimore A., Dumrese T., Hengartner H., Zinkernagel R.M., Rammensee H.G. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. J. Exp. Med., 1998, V.187, N. 10, P. 1647-1657.
- 118. Fischer Lindahl K., Wilson D.B. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes II. Estimates of frequency and specificity of precursors. J. Exp. Med., 1977, V. 145, P. 508-522.
- 119. Bevan M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. J. Exp. Med., 1976, V. 143, P. 1283-1288.
- 120. Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. Front. Biosci., 1999, V. 4, P. D476-480.
- 121. Gould D.S., Auchincloss H. Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. Immunol. Today, 1999, V. 20, P. 77-82.
- 122. Benichou G., Valujskikh A., Heeger P.S. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. J. Immunol., 1999, V. 162, N. 1, P. 352-358.
- 123. Valujskikh A., Hartig C., Heeger P.S. Indirectly primed CD8⁺ T cells are a prominent component of the allogeneic T-cell repertoire after skin graft rejection in mice. Transplantation, 2001, V. 71, N. 3, P. 418-421.
- 124. Boisgerault F., Liu Y., Anosova N., Ehrlich E., Dana M.R., Benichou G. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. J. Immunol., 2001, V. 167, N. 4, P. 1891-1899.
- 125. Illigens B.M., Yamada A., Fedoseyeva E.V., Anosova N., Boisgerault F., Valujskikh A., Heeger P.S., Sayegh M.H., Boehm B., Benichou G. The relative contribution of direct and indirect antigen recognition pathways to the alloresponse and graft rejection depends upon the nature of the transplant. Hum. Immunol., 2002, V. 63, N. 10, P. 912-925.
- 126. Rudensky A.Yu., Rath S., Preston-Hurlburt P., Murphy D.B., Janeway C.A. Jr. On the complexity of self. Nature, 1991, V. 353, N. 6345, P. 660-662.
- 127. Rudensky A.Yu., Preston-Hurlburt P., Hong S.C., Barlow A., Janeway C.A. Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature, 1991, V. 353, N. 6345, P. 622-627.

- 128. Chicz R.M., Urban R.G., Gorga J.C., Vignali D.A., Lane W.S., Strominger J.L. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. J. Exp. Med., 1993, V. 178, N. 1, P. 27-47.
- 129. de Koster H.S., van Rood J.J., Termijtelen A. HLA-DR peptide-induced alloreactive T cell lines reveal an HLA-DR sequence that can be both "dominant" and "cryptic": evidence for allelespecific processing. Eur. J. Immunol., 1992, V. 22, N. 6, P. 1531-1539.
- 130. Benichou G., Fedoseyeva E., Lehmann P.V., Olson C.A., Geysen H.M., McMillan M., Sercarz E.E. Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. Implications for selective immune therapy in transplantation. J. Immunol., 1994, V. 153, N. 3, P. 938-945.
- 131. Benichou G., Fedoseyeva E.V. The contribution of peptides to T cell allorecognition and allograft rejection. Int. Rev. Immunol., 1996, V. 13, N. 3, P. 231-243.
- 132. Kazanskii D.B., Petrishchev V.N., Shtil' A.A., Chernysheva A.D., Sernova N.V., Abronina I.F., Pobezinskii L.A., Agafonova E.L. Use of heat shock of antigen-presenting cells for functional testing of allospecific memory T-cells. Bioorg. Khim., 1999, V. 25, N. 2, P. 117-128.
- 133. Pobezinskaya E.L., Pobezinskii L.A., Silaeva Y.Y., Anfalova T.V., Khromykh L.M., Tereshchenko T.S., Zvezdova E.S., Kazanskii D.B. Cross-reactivity of T cell ceceptor on memory CD8⁺ cells isolated after immunization with allogeneic tumor cells. Bull. Exp. Biol. Med., 2004, V. 137, N. 5, P. 493-498.
- 134. Kazanskii D.B., Chernysheva A.D., Sernova N.V., Petrishchev V.N., Pobezinskii L.A., Agafonova E.L., Chervonskii A.V. The nature of epitopes, recognized by T-lymphocytes in the allogenic immune response. Mol. Biol. (Mosk)., 1998, V. 32, N. 4, P. 692-702.
- 135. Brondz B.D. Complex specificity of immune lymphocytes in allogeneic cell cultures. Fol. Biol., 1968, V.14, P. 115-131.
- 136. Goldstein S.A., Mescher M.F. Cell-sized, supported artificial membranes (pseudocytes): response of precursor cytotoxic T lymphocytes to class I MHC proteins. J. Immunol., 1986, V. 137, N. 11, P. 3383-3392.
- 137. Kane K.P., Champoux P., Mescher M.F. Solid-phase binding of class I and II MHC proteins: immunoassay and T cell recognition. Mol. Immunol., 1989, V. 26, N. 8, P. 759-768.
- 138. Manning T.C., Rund L.A., Gruber M.M., Fallarino F., Gajewski T.F., Kranz D.M. Antigen recognition and allogeneic tumor rejection in CD8⁺ TCR transgenic/RAG^{-/-} mice. J. Immunol., 1997, V. 159, N. 10, P. 4665-4675.
- 139. Zhan Y., Corbett A.J., Brady J.L., Sutherland R.M., Lew A.M. CD4 help-independent induction of cytotoxic CD8 cells to allogeneic P815 tumor cells is absolutely dependent on costimulation. J. Immunol., 2000, V. 165, N. 7, P. 3612-3619.
- 140. Habiro K., Kotani M., Omoto K., Kobayashi S., Tanabe K., Shimmura H., Suzuki K., Hayashi T., Toma H., Abe R. Mechanism of allorecognition and skin graft rejection in CD28 and CD40 ligand double-deficient mice. Transplantation, 2003, V. 76, N. 5, P. 854-858.
- 141. Kreisel D., Krupnick A.S., Balsara K.R., Riha M., Gelman A.E., Popma S.H., Szeto W.Y., Turka L.A., Rosengard B.R. Mouse vascular endothelium activates CD8⁺ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. J. Immunol., 2002, V. 169, N. 11, P. 6154-6161.

- 142. Kreisel D., Krupnick A.S., Gelman A.E., Engels F.H., Popma S.H., Krasinskas A.M., Balsara K.R., Szeto W.Y., Turka L.A., Rosengard B.R. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8⁺ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. Nat. Med., 2002, V. 8, N. 3, P. 233-239.
- 143. Pietra B.A., Wiseman A., Bolwerk A., Rizeq M., Gill R.G. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. J. Clin. Invest., 2000, V. 106, N. 8, P. 1003-1010.
- 144. Pimenta-Araujo R., Mascarell L., Huesca M., Cumano A., Bandeira A. Embryonic thymic epithelium naturally devoid of APCs is acutely rejected in the absence of indirect recognition. J. Immunol., 2001, V. 167, N. 9, P. 5034-5041.
- 145. Kreisel D., Krasinskas A.M., Krupnick A.S., Gelman A.E., Balsara K.R., Popma S.H., Riha M., Rosengard A.M., Turka L.A., Rosengard B.R. Vascular endothelium does not activate CD4⁺ direct allorecognition in graft rejection. J. Immunol., 2004, V. 173, N. 5, P. 3027-3034.
- 146. Janeway C.A.Jr., Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. Cell, 1994, V. 76, P. 275-285.
- 147. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S, Allen P.M, Dustin M.L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science. 1999, V. 285, N. 5425, P. 221-227.
- 148. Holdorf A.D., Lee K.H., Burack W.R., Allen P.M., Shaw A.S. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. Nat Immunol., 2002, V. 3, N. 3, P. 259-264.
- 149. O'Keefe J.P., Blaine K., Alegre M.L., Gajewski T.F. Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8⁺ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2004, V. 101, N. 25, P. 9351-9356.
- 150. Goldstein J.S., Chen T., Gubina E., Pastor R.W., Kozlowski S. ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8⁺ T cells without an organized immunological synapse. Eur. J. Immunol., 2000, V. 30, N. 11, P. 3266-3270.
- 151. Ding L., Shevach E.M. Activation of CD4⁺ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). Eur. J. Immunol., 1994, V. 24, N. 4, P. 859-866.
- 152. Marelli-Berg F.M., Hargreaves R.E., Carmichael P., Dorling A., Lombardi G., Lechler R.I. Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific nonresponsiveness in naive T cells. J. Exp. Med., 1996, V. 183, N. 4, P. 1603-1612.
- 153. Marelli-Berg F.M., Frasca L., Imami N., Lombardi G., Lechler R.I. Lack of T cell proliferation without induction of nonresponsiveness after antigen presentation by endothelial cells. Transplantation, 1999, V. 68, N. 2, P. 280-287.
- 154. Smythe J.A., Fink P.D., Logan G.J., Lees J., Rowe P.B., Alexander I.E. Human fibroblasts transduced with CD80 or CD86 efficiently trans-costimulate CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in HLA-restricted reactions: implications for immune augmentation cancer therapy and autoimmunity. J. Immunol., 1999, V. 163, N. 6, P. 3239-3249.

- 155. Kundig T.M., Bachmann M.F., DiPaolo C., Simard J.J., Battegay M., Lother H., Gessner A., Kuhlcke K., Ohashi P.S., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Fibroblasts as efficient antigenpresenting cells in lymphoid organs. Science, 1995, V. 268, N. 5215, P. 1343-1347.
- 156. Ochsenbein A.F., Sierro S., Odermatt B., Pericin M., Karrer U., Hermans J., Hemmi S., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. Nature, 2001, V. 411, N. 6841, P. 1058-1064.
- 157. Zerrahn J., Held W., Raulet D.H. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. Cell. 1997. V. 88. P. 627-636.
- 158. Sebzda E., Mariathasan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M.F., Ohashi P.S. Selection of the T cell repertoire. Annu. Rev. Immunol., 1999, V. 17, P. 829-874.
- 159. Bevan M.J. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. Immunol. Today, 1984, V. 5, P. 128-130.
- 160. Matzinger P., Bevan M.J. Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility complex antigens? Cell. Immunol., 1977, V. 29, P. 1-5.
- 161. Mullbacher A., Hill A. B., Blanden R. V., Cowden W. B., King N. J., Hla R. T. Alloreactive cytotoxic T cells recognize MHC class I antigen without peptide specificity. J. Immunol. 1991. V. 147. P. 1765-1772.
- 162. Smith P.A., Brunmark A., Jackson M.R., Potter T.A. Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL). J. Exp. Med., 1997, V. 185, P. 1023-1033.
- 163. Heath W.R., Kane K.P., Mescher M.F., Sherman L.A.. Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1991, V. 88, P. 5101–5105.
- 164. Kovalik J.-P., Singh N., Mendiratta S.K., Martin W.D., Ignatowicz L., Van Kaer L. The alloreactive and self-restricted CD4⁺ T cell response directed against a single MHC class II/peptide combination. J. Immunol., 2000, V.165, P. 1285-1293.
- 165. Schneck J., Munitz T., Coligan J.E., Maloy W.L., Margulies D.H., Singer A. Inhibition of allorecognition by an H-2K^b-derived peptide is evidence for a T-cell binding region on a major histocompatibility complex molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1989, V. 86(21), P. 8516-8520.
- 166. Schneck J., Maloy W.L., Coligan J.E., Margulies D.H. Inhibition of an allospecific T cell hybridoma by soluble class I proteins and peptides: estimation of the affinity of a T cell receptor for MHC. Cell, 1989, V. 56, N. 1, P. 47-55.
- 167. Brondz B. D., Kazansky D. B., Chernysheva A. D., Ivanov V. S. Peptides of a major histocompatibility complex class I (K^b) molecule cause prolongation of skin graft survival and induce specific down-regulatory T cells demonstrable in the mixed lymphocyte reaction. Immunology, 1995, V. 86, P. 219-223.
- 168. Falk K., Rotzschke O., Rammensee H.G. A self peptide naturally presented by both H-2K^b and H-2K^{bm1} molecules demonstrates MHC restriction of self tolerance at the molecular level. Int. Immunol., 1992, V. 4, N. 3, P. 321-325.

- 169. Grandea A.G. 3rd, Bevan M.J. A conservative mutation in a class I MHC molecule outside the peptide binding groove stimulates responses to self peptides. J. Immunol., 1993, V. 151, N. 8, P. 3981-3987.
- 170. Noun G., Reboul M., Abastado J.P., Kourilsky P., Sigaux F., Pla M. Strong alloantigenicity of the alpha-helices residues of the MHC class I molecule. J. Immunol.., 1998, V. 161, N. 1, P. 148-153.
- 171. Sun R., Shepherd S. E., Geier S. S., Thomson C. T., Sheil J. M., Nathenson S. G. Evidence that the antigen receptors of cytotoxic T lymphocytes interact with a common recognition pattern on the H-2K^b molecule. Immunity. 1995. V. 3. P. 573-582.
- 172. Hornell T.M., Solheim J.C., Myers N.B., Gillanders W.E., Balendiran G.K., Hansen T.H., Connolly J.M. Alloreactive and syngeneic CTL are comparably dependent on interaction with MHC class I alpha-helical residues. J. Immunol., 1999, V. 163, N. 6, P. 3217-3225.
- 173. Manning T.C., Schlueter C.J., Brodnicki T.C., Parke E.A., Speir J.A., Garcia K.C., Teyton L., Wilson I.A., Kranz D.M. Alanine scanning mutagenesis of an alphabeta T cell receptor: mapping the energy of antigen recognition. Immunity, 1998, V. 8, P. 413–425.
- 174. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z., Lyons D., Hampl J., Arden B., and Chien Y.-h. Ligand recognition by αβ T cell receptors. Annu. Rev. Immunol., 1998, V. 16, P. 523-544.
- 175. Reiser J.B., Darnault C., Guimezanes A., Gregoire C., Mosser T., Schmitt-Verhulst AM., Fontecilla-Camps J.C., Malissen B., Housset D., Mazza G. Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. Nat. Immunol. 2000. V. 1. P. 291-297.
- 176. Eisen H.N. Specificity and degeneracy in antigen recognition: yin and yang in the immune system. Annu. Rev. Immunol., 2001, V. 19, P. 1-21.
- 177. Merkenschlager M., Graf D., Lovatt M., Bommhardt U., Zamoyska R., Fisher A.G. How many thymocytes audition for selection? J. Exp. Med., 1997, V. 186, P. 1449-1158.
- 178. Yang T.H., Lovatt M., Merkenschlager M., Stauss H.J. Comparison of the frequency of peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by self- and allo-MHC following in vitro T cell priming. Int. Immunol., 2002, V. 14, N. 11, P. 1283-1290.
- 179. Clark S.P., Arden B., Kabelitz D., Mak T.W. Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies. Immunogenetics, 1995, V. 42, N. 6, P. 531-540.
- 180. Criscitiello M.F., Wermenstam N.E., Pilstrom L., McKinney E.C. Allelic polymorphism of T-cell receptor constant domains is widespread in fishes. Immunogenetics, 2004, V. 55, N. 12, P. 818-824.
- 181. Lobashevsky A, Kotb M, Gaber AO. Selective T cell receptor Vβ gene usage by alloreactive T cells responding to defined HLA-DR alleles. Transplantation, 1996, V. 62, N. 9, P. 1332-1340.
- 182. Li Y.Y., Smith K.D., Shi Y., Lutz C.T. Alloreactive anti-HLA-B7 cytolytic T cell clones use restricted T cell receptor genes. Transplantation, 1996, V. 62, N. 7, P. 954-961.
- 183. Guillet M., Brouard S., Gagne K., Sebille F., Cuturi M.C., Delsuc M.A., Soulillou J.P. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. J. Immunol., 2002, V. 168, N. 10, P. 5088-5095.

- 184. Torres-Nagel N., Deutschlander A., Herrmann T., Arden B., Hunig T. Control of TCR V alpha-mediated positive repertoire selection and alloreactivity by differential J alpha usage and CDR3 alpha composition. Int. Immunol., 1997, V. 9, N. 10, P. 1441-1452.
- 185. Sim B.C., Zerva L., Greene M.I., Gascoigne N.R. Control of MHC restriction by TCR Valpha CDR1 and CDR2. Science, 1996, V. 273, N. 5277, P. 963-966.
- 186. Sim B.C., Aftahi N., Reilly C., Bogen B., Schwartz R.H., Gascoigne N.R., Lo D. Thymic skewing of the CD4/CD8 ratio maps with the T-cell receptor alpha-chain locus. Curr. Biol., 1998, V. 8, N. 12, P. 701-704.
- 187. Gascoigne N.R., Alam S.M., Lin C.M., McGuire M.V., Marine S., Niederberger N., Redpath S., Sim B.C., Travers P.J., Yachi P., Zal M.A., Zal T. T cell receptor binding kinetics and special role of Valpha in T cell development and activation. Immunol. Res., 2000, V. 21, N. 2-3, P. 225-231.
- 188. Punt J.A., Osborne B.A., Takahama Y., Sharrow S.O., Singer A. Negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. J. Exp. Med., 1994, V. 179, N. 2, P. 709-713.
- 189. Punt J.A., Havran W., Abe R., Sarin A., Singer A. T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes by two distinct mechanisms differing in their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. J. Exp. Med., 1997, V. 186, N. 11, P. 1911-1922.
- 190. Ashton-Rickardt P.G., Bandeira A., Delaney J.R., Van Kaer L., Pircher H.P., Zinkernagel R.M., Tonegawa S. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. Cell, 1994, V. 76, N. 4, P. 651-663.
- 191. Sebzda E., Wallace V.A., Mayer J., Yeung R.S., Mak T.W., Ohashi P.S. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. Science, 1994, V. 263, N. 5153, P. 1615-1618.
- 192. Viret C., Janeway C.A. Jr. MHC and T cell development. Rev. Immunogenet., 1999, V. 1, N. 1, P. 91-104.
- 193. Chervonsky A.V., Golovkina T.V., Ross S.R., Janeway C.A. Jr. Differences in the avidity of TCR interactions with a superantigenic ligand affect negative selection but do not allow positive selection. J. Immunol., 1995, V. 155, N. 11, P. 5115-5123.
- 194. Pircher H., Rohrer U.H., Moskophidis D., Zinkernagel R.M., Hengartner H. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. Nature, 1991, V. 351, N. 6326, P. 482-485.
- 195. Janeway C.A., Chervonsky A.V., Sant'Angelo D. T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? Curr. Biol., 1997, V. 7, N. 5, P. R299-300.
- 196. Huseby E.S., Crawford F., White J., Kappler J., Marrack P. Negative selection imparts peptide specificity to the mature T cell repertoire. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2003, V. 100, N. 20, P. 11565-11570.
- 197. Huseby E., Kappler J., Marrack P. TCR-MHC/peptide interactions: kissing-cousins or a shotgun wedding? Eur. J. Immunol., 2004, V. 34, N. 5, P. 1243-1250.

198. Whitelegg A., Barber L.D. The structural basis of T-cell allorecognition. Tissue Antigens, 2004, V. 63, N. 2, P. 101-108.