

ПРИРОДА АЛЛОГЕННОГО ОТВЕТА

Казанский Д.Б.

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Резюме. Молекулы МНС являются наиболее «сильными» трансплантационными антигенами, прямое взаимодействие с которыми определяет ответ 95-98% клонов Т-клеток аллогенного реципиента, активирующихся в ответе на трансплантат. Взаимодействие с молекулами МНС является критически важным для позитивной селекции Т-лимфоцитов в тимусе и приобретения ими способности отличать «свое» от «чужого». В этом свете аллореактивность рассматривали как кросс-реактивность с чужеродными молекулами МНС, возникающую вследствие селекции репертуара на «своих» молекулах МНС. Репертуар Т-лимфоцитов образуется 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, репертуар Т-лимфоцитов, искусственно сформированный в отсутствие процессов селекции, обладает врожденной способностью реагировать с различными аллельными формами молекул МНС. В отличие от герминальных последовательностей генных сегментов TCR молекулам МНС свойственен значительный внутривидовой полиморфизм. Процессы негативной и позитивной селекции имеют целью адаптацию репертуара к окружению трансплантационных антигенов конкретного индивидуума, основной целью которой является устранение аутореактивных клонов с сохранением широкого спектра специфичности к потенциальным патогенам. Последние результаты показывают, что позитивная селекция Т-клеток в тимусе является результатом вырожденного распознавания эндогенных комплексов молекул МНС с пептидами. Напротив, центральная толерантность к «своему» формируется в результате высокоаффинного специфического взаимодействия с эндогенными комплексами молекула МНС/пептид. В этом свете негативную селекцию в тимусе можно рассматривать как аллогенную реакцию репертуара на собственные молекулы МНС, идущую в течение всей жизни хозяина, а реакции зрелого репертуара на индивидуальные антигенные пептиды - как перекрестные реакции Т-клеток, реактивных к посторонним трансплантационным антигенам. По всей видимости, такое понимание проблемы раскрывает возможную природу и значение аллогенных реакций.

Ключевые слова: МНС, тимус, аллореактивность, толерантность, трансплантат.

Kazanskii D.B.

ORIGINS OF ALLOGENEIC RESPONSE

Abstract. The MHC molecules are the strongest transplantational antigens determining direct interaction with 95-98% of T cell clones activating in response to allograft. Interaction with MHC molecules is critically important for positive selection of thymocytes and subsequent acquiring the capability to recognize "self" and "foreign". In this light, alloreactivity was recognized as cross-reactivity with foreign MHC that appeared as result of repertoire selection on "self" MHC molecules. The T lymphocyte repertoire is formed in the thymus as a result of random rearrangement of germinal sequences of TCR gene fragments and other processes that bring about the diversity of TCRs. As shown by D. Raulet and co-workers, repertoire of T lymphocytes artificially formed at the absence of selection processes, is inherently capable of reacting with different allelic forms of MHC molecules. In contrast to germinal sequences of TCR fragments, the MHC molecules are characterized by a significant interspecies polymorphism. So, negative and positive selection are aimed at the adaptation of repertoire to the specific MHC-environment of certain individual. The overall goal of adaptation is the elimination of autoreactive clones and sparing a broad spectrum of specificity to potential pathogens. Recent results have shown that positive selection in thymus was result of degenerative recognition of endogenous MHC/peptide complexes. In contrast, central tolerance to "self" is formed as result of high affinity specific interaction with self MHC/peptide complexes. From this viewpoint the negative selection in the thymus can be considered as a life-long allogenic reaction of repertoire to self MHC molecules; the responses of

Адрес для переписки:

Казанский Дмитрий Борисович,
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.
ГУ Российский онкологический научный центр РАМН.
Тел.: 8(095)-324-55-13, факс 8(095)-324-12-05.
E-mail: kazansky@dataforce.net

the mature T cell repertoire to individual antigenic peptides can be considered as cross-reactions of T cells reactive to foreign transplantational antigens. I believe that this interpretation can unveil the origins and biological meaningfulness of allogenic reactions. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 477-488)

Природа аллогенного ответа

1. Механизмы аллогенного распознавания: прямое и непрямое распознавание

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 H-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 вызывают также 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 в более высокой частоте аллореактивных предшественников по сравнению с клетками, специфичными к антигенам, которые презентуются 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 [19].

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 антигенпрезентирующей клетки (АПК). Большинство исследователей предполагает, 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 прямого аллогенного распознавания предполагает рас-

познавание 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, захваченных путем эндоцитоза дендритными клетками реципиента, и последующего кросс-примирования Т-лимфоцитов реципиента [5, 7, 21].

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 Жилем Бенишу с использованием метода ELISPOT, позволяющего определить продукцию цитокинов отдельными клетками. В различные временные точки после пересадки полностью аллогенного трансплантата кожи мышей B10.A ($K^kI^dD^dL^d$) реципиентам BALB/c ($K^dI^dD^dL^d$) 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 [5, 6]. В аналогичном исследовании «прямых» и «непрямых» ответов клеток $CD8^+$, продуцирующих $IFN\gamma$, частоты Т-клеток, распознающих аллоантиген прямо, были выше в 30-60 раз [62]. То, в какой мере тот или иной тип распознавания будет иметь место, зависит от вида трансплантата, характера антигенных различий и доступности костимуляторных лигандов АПК [12, 28].

Феномен прямого аллогенного распознавания трудно объяснить в рамках общепринятой гипотезы онтогенетического происхождения МНС-рестрикции, согласно которой Т-лимфоциты проходят в тимусе «адаптивную дифференцировку», направленную на формирование способности Т-клеточного репертуара распознавать чужеродные антигены только в контексте молекул МНС хозяина. Хотя экспериментальная основа этой гипотезы существенно размыта работами последнего десятилетия [3, 39, 40, 48, 60, 66], она до сих пор разделяется большинством иммунологов. 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 тогда, когда донор и реци-

пиент различаются лишь по главным антигенам 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 II мыши и человека часто презентуют пептиды, происходящие из белков, вовлеченных в процессинг, в том числе, самих молекул МНС класса II [9, 51, 52]. К тому же, в ряде работ был достигнут успех в идентификации пептидов молекул МНС, вовлеченных в не прямое аллогенное распознавание [10, 11, 33]. Для демонстрации «непрямого 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 презентующему аллелю МНС, использованием АПК мышей, дефицитных в экспрессии МНС, или использованием АПК рекомбинантных мышей, экспрессирующих другие презентующие аллели. Более того, не проводилось фенотипирование пролиферирующих клеток, исходя из уверенности, что в такой MLR *a priori* пролиферируют клетки CD4⁺ [21].

Для исследования ответов на аллогенные молекулы МНС класса I мы использовали сходную систему, в которой мышью C57BL/10 (H-2^b), иммунизировали клетками мастоцитомы P815 (H-2^d), а рестимуляцию в MLR *in vitro* проводили через 2 месяца нормальными спленоцитами мышью 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 мышью 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 мышью 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⁺. Они распознавали иммунизирующий аллоантиген «прямо», поскольку пролиферативный ответ клеток памяти мышью R101 блокировался антителами к молекуле H-2K^b и не развивался, если в качестве стимуляторов в MLR использовали клетки нокауты по молекулам TAP и β₂-микроглобулина на генетической основе мышью C57BL/6 (H-2^b) [31, 45]. Эти результаты подтверждаются данными, полученными в исследованиях ответов клеток памяти на мутантные молекулы МНС. Распознавание клетками памяти молекулы H-2K^b нарушается как мутацией в регионе, связывающем пептид (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). [32]. Таким образом, даже в условиях, благоприятствующих «непрямому» распознаванию – таких как иммунизация клетками аллогенных опухолей, не являющимися профессиональными АПК, в иммунном ответе доминируют Т-клетки CD8⁺, распознающие аллоантиген в соответствии с моделью «прямого аллогенного распознавания».

2. Природа прямого аллогенного распознавания: распознавание пептидов или боковых цепей?

Различные аллельные формы молекул МНС презентуют различные спектры пептидов эндогенных и экзогенных антигенов. Специфичность и эффективность связывания молекул МНС с пептидами определяется наличием в структуре пептидов мотивов из определенных аминокислотных остатков, несущих якорную функцию [50]. Таким образом, различные молекулы МНС презентуют Т-лимфоцитам различные пептиды одного и того же антигена. Эта закономерность очень важна, поскольку может представлять собой альтернативное объяснение и реальную молекулярную основу МНС-рестрикции. Согласно этой гипотезе, специфичность и МНС-рестрикция эффекторных Т-клеток определяются конкретными комбинациями молекул МНС и антигенных пептидов, которые индуцировали иммунный ответ. Иными словами, МНС-рестрикция является свойством не всего репертуара Т-клеток, а лишь той его части, которая была примирована первичной иммунизацией. Очевидно, что в аллогенном

ответе спектры пептидов, презентруемых Т-клеткам аллогенными АПК, практически полностью отличаются от спектра пептидов, презентруемых собственными АПК реципиента, обуславливая высокую антигенность аллогенных клеток.

Есть работы, показывающие, что аллореактивные Т-клетки могут распознавать детерминанты молекул МНС, не зависящие от связанного пептида [42, 58]. Тем не менее, большинство свидетельств указывает на то, что пептидnezависимое распознавание является относительно редким событием и что аллореактивные клетки распознают аллогенные молекулы МНС в ассоциации с пептидами, часто с высокой специфичностью [2, 24, 50]. 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^dI^dD^b), полученные в ответе на клетки тимомы EL4 (K^bD^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 нокауты по молекулам ТАР. Это свидетельствует о зависимости прямого распознавания молекулы Н-2К^b на поверхности аллогенной АПК от пептидов, связанных с этой молекулой [45]. Интересные и убедительные данные о роли пептидов в аллореактивности были получены в системе "single МНС/peptide", использующей трансгенных мышей рЕ α , все молекулы МНС класса II которых представлены индивидуальным комплексом молекулы A^b с пептидом AA 52-68 молекулы E α , 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 находок, характеризующих механизмы аллогенного и аллорестриктированного распознавания. Во-первых, оба лиганда оказались «плохими» стимуляторами аллогенного ответа, что подчеркивает важность презентации разнообразного репертуара пептидов для индукции интенсивного аллогенного ответа. Во вторых, Т-клеточные гибридомы, полученные в аллогенном ответе на такие комплексы (аллорестриктированные), характеризовались более высокой 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 α -спиралей молекулы МНС, которые распоз-

наются аллореактивными Т-клеточными 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 [34]. 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, окаймляющие желобок для связывания пептида, тоже взаимодействуют с TCR, что может иметь важное значение в проявлении феномена аллореактивности. Цитотоксические Т-лимфоциты способны лизировать аллогенные клетки мишени, лишённые ТАР и поэтому экспрессирующие лишь небольшое количество «пустых» тяжелых цепей молекул МНС класса I на поверхности клетки. Более того, у мышей bm3 с нокаутированным геном ТАР клетки CD8⁺ образуются в тимусе и в больших количествах накапливаются в периферических лимфоидных органах, что свидетельствует о возможности прохождения позитивной селекции на этой молекуле, хотя ее экспрессия на поверхности клетки нестабильна в отсутствие связанных с ней пептидов [35]. Группой Сингера было показано, что аллогенное распознавание молекулы Н-2К^b цитотоксическими Т-лимфоцитами может быть подавлено пептидом той же молекулы AA163-174, что свидетельствует о существовании региона для связывания тяжелой цепи молекулы МНС с TCR [53, 54]. 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 [8]. Ряд доказательств взаимодействия TCR с остатками молекул МНС был получен с использованием мутантных молекул МНС. Некоторые точечные мутации в боковых α -спиралях молекул МНС не оказывают влияния на спектр связанных с ними пептидов, но, тем не менее, вызывают интенсивный аллогенный ответ [18, 22]. Подробный анализ аллоантигенных свойств молекулы Н-2К^d был проведен группой Марики Пла. Было показано, что мутации в позициях 62, 65, 69, 72, 152, 163, 166 α -спиралей, локализованные вне области, связывающей пептид, могут быть антигенными. Авторы проанализировали репертуар пептидов, которые связывались с индивидуальными мутантными молекулами и не обнаружили никакой корреляции между пептидами, презентруемыми этими мутантными

формами и их способностью вызывать первичный аллогенный ответ [43]. Были также предприняты попытки определить конкретные аминокислотные остатки, вовлеченные в распознавание молекул МНС класса I аллореактивными и ауторестрированными цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). С использованием больших панелей ауторестрированных и аллореактивных клонов CTL и мишеней, экспрессирующих мутантные молекулы с измененными остатками, было показано, что их распознавание аллореактивными и ауторестрированными клонами зависит от одних и тех же остатков тяжелых цепей, формирующих общие паттерны распознавания [25, 59]. Картирование относительных энергий взаимодействия TCR с остатками тяжелой цепи молекулы МНС 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 I [38]. Эти данные свидетельствуют о том, что феномен аллореактивности не может быть полностью объяснен одними лишь различиями в репертуаре пептидов, презентруемых различными молекулами МНС. Не менее важную роль играют остатки боковых α -спиралей, способные к прямому взаимодействию с TCR.

Молекулы МНС презентруют 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 TCR/МНС/пептид. Топология взаимодействия между этими молекулами, в основном, совпадает. Т-клеточный рецептор ориентирован по диагонали относительно внешней поверхности комплекса пептид/МНС. В пространственной структуре контакта TCR/МНС/пептид петли CDR1 и CDR2 α -цепи TCR располагаются около N-концевой части пептида, тогда как сходные участки β -цепи находятся около C-концевой части пептида. В основном, петли CDR1 и CDR2, кодируемые V-регионом, взаимодействуют с аминокислотными остатками молекул МНС. Наибольшей вариабельностью обладает третий регион TCR, определяющий комплементарность взаимодействия с молекулой МНС – CDR3. Регионы CDR3 альфа- и бета-цепей TCR ориентированы по центру контакта (TCR/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 CDR3 α и

CDR3 β цепи молекулы TCR обладают наилучшим доступом к наиболее вариабельной части лиганда - пептиду [16]. Сходный принцип организации взаимодействия TCR/МНС оказался у аллоспецифического TCR V α 3.3, взаимодействующего с молекулой МНС класса I H-2K^b, связанной с естественно процессированным октапептидом (pBM1: INFDFNTI). Особенностью этого комплекса является то, что взаимодействие данных TCR и пептида, связанного с молекулой МНС, обусловлено практически только регионом CDR 3 β , 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 C-конце пептида оказались вовлечены во взаимодействие с рецептором. Второй особенностью этой комбинации оказалась очень малая площадь интерфейса между взаимодействующими TCR и МНС – наименьшая из всех известных, несмотря на то, что аффинность взаимодействия, определенная методом поверхностного плазменного волнового резонанса, оказалась высокой – на верхней границе ранга известных значений. Регион CDR3 α этого рецептора велик, состоит из 11 аминокислотных остатков, смещен в сторону от пептид-связывающего желобка и взаимодействует лишь с остатком Gln⁶⁵ α -спирали домена α_1 молекулы МНС, тогда как CDR3 β – состоит из 9 аминокислотных остатков и полностью опосредует взаимодействие с пептидом. Соответственно, CDR1 α и CDR2 α оказываются смещенными к N-концу α -спирали домена α_2 молекулы МНС в сторону от области связывания пептида, что препятствует их взаимодействию с α -спиралями молекулы МНС. Иными словами, положение TCR V α 3.3, связанного с лигандом, оказывается «скособоченным» и обусловленным, в основном, взаимодействиями с остатками V β -цепи рецептора с боковой цепью молекулы МНС и C-концевой частью пептида. Такие особенности взаимодействия могут лежать в основе вырожденности распознавания пептидов в аллогенном ответе. Для частной комбинации TCR/МНС/пептид разнообразие пептидов, которые могли бы успешно участвовать во взаимодействии с TCR V α 3.3, возросло бы в 400 раз [49]. Данные рентгеноструктурного анализа являются самым ярким подтверждением прямого взаимодействия TCR с аллогенной молекулой МНС. Они не выявили принципиальных отличий аллореактивных и ауторестрированных TCR в топологии их взаимодействия с МНС/пептидными комплексами. Различия в длине регионов CDR3 у TCR V α 3.3 дают структурные основания для объяснения причин вырожденности распознавания им пептидного лиганда, хотя и не объясняют причин высокой частоты клонов, реагирующих на аллогенные молекулы МНС.

По-видимому, вырожденное распознавание комплексов молекула МНС/пептид Т-клеточными ре-

цепторами является общей особенностью любых Т-клеточных рецепторов. Действительно, когда проводится детальный анализ кросс-реактивности известных индивидуальных TCR, он обычно приводит к выявлению дополнительных молекул МНС или пептидных лигандов, способных к взаимодействию с ними. Кросс-реактивность обнаружилась и у полученного нами аллореактивного клона клеток памяти CD8⁺ МСС-1, полученного в ответе на аллогенную молекулу Н-2К^b. Помимо иммунизирующего антигена он способен активироваться в ответе на Н-2D^d(L^d) и Н-2D^a(L^a). Вместе с тем его TCR не имеет существенных различий в длине CDR3-регионов α - и β -цепи [45]. 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” [17].

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 специфический 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.

3. Возврат к гипотезе Эрне

Есть ли основания полагать, что способность репертуара Т-рецепторов 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 [66, 40]. 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 [40]. В работе Церрана и Руле в качестве модели были использованы 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 TCR α/β и CD4 в органных культурах тимуса (FTOC) авторы эффективно индуцировали созревание таких тимоцитов. Анализ специфичности TCR этих клеток показал высокую частоту клонов, реагирующих с аллогенными молекулами МНС в 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 [66].

Эти результаты способны до основания потрясти привычную картину мира, сложившуюся в сознании иммунологов. Ведь они означают, что: 1) предпочтение во взаимодействии TCR с МНС не является следствием 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 (α/δ , β и МНС); 3) аллореактивность и МНС-рестрикция могут являться прямыми следствиями такой врожденной специфичности. Работа Янга и Стаусса (2002) стала логическим продолжением этих работ. Авторы показали, что МНС-рестриктированное распознавание пептидов также является врожденным свойством, внутренне присущим репертуару Т-клеток и не требует тимусной селекции молекулами МНС [65].

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 TCR [1]. Тем не менее,

число возможных гаплотипов МНС в реальной популяции может исчисляться сотнями. Генам, кодирующим $V\alpha$ и $V\beta$ -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 [14, 15]. Эти факты указывают на то, что, несмотря на разнообразие, создаваемое реаранжировкой генов TCR, и множественность гаплотипов МНС, взаимодействие TCR с молекулами МНС 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 $V\alpha$ и $V\beta$ [23, 36, 37, 61]. Это же имеет место и в ходе тимусной селекции. Определенные варианты $V\alpha$ «предпочитают» взаимодействовать с молекулами определенного класса МНС. Т-клетки, несущие такие TCRV α предпочтительно 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 $V\alpha$ и точечные мутации в этих районах способны поменять дифференцировку клеток с CD4⁺ на CD8⁺ [20, 56, 57].

Важно отметить, что гипотеза о генетической предрасположенности репертуара к распознаванию молекул гистосовместимости, была предложена Эрне еще в 1971 г. Согласно ей «специфичность антител определяется структурными V-генами, которые кодируют аминокислотные последовательности переменных 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 клеток, чувствительных к антигену. 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 состоит из лимфоцитов, отторгающих аллотрансплантат, которые экспрессирует прочие V-гены субпопуляции A, 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 суп-

рессия 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 разнообразие антигенчувствительных клеток, отражающее разнообразие антител. Пролиферация лимфоцитов, экспрессирующих V-гены субпопуляции A, создает антигенчувствительные клетки, которые ответственны за аллоагрессию» [30]. Несмотря на то, что этой гипотезе уже более 30 лет, ее актуальность в наши дни поражает.

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

Феномен аллореактивности часто пытаются объяснить в терминах кросс-реактивности со «своим» и такое объяснение можно встретить в подавляющем большинстве современных учебников иммунологии. Это традиционное объяснение пытается разрешить явное и очевидное противоречие между существованием феномена прямого аллогенного распознавания и гипотезой онтогенетического происхождения МНС-рестрикции, согласно которой репертуар Т-лимфоцитов «обучается» распознаванию антигенных пептидов в контексте собственных молекул МНС хозяина в процессе позитивной селекции в тимусе. С этой гипотезой до сих пор согласно большинство иммунологов, хотя критическая масса противоречащих ей фактов, по-видимому, давно преодолена [3, 34, 39, 41, 48, 60, 65]. В свете этой гипотезы взаимодействие Т-клеток с аллогенными молекулами МНС является перекрестной реакцией репертуара, «обученного» распознавать собственные молекулы МНС организма. Сторонников «кросс-реактивного» толкования природы аллогенных ответов впору было бы спросить, часто ли они наблюдают перекрестные реакции, значительно превышающие по интенсивности специфическую? Ответ, по всей видимости, будет отрицательным. Здравый смысл подсказывает, что «на самом деле всё наоборот» – специфической является реакция репертуара на чужеродные трансплантационные антигены, тогда как распознавание обычных пептидных антигенов в контексте собственных молекул МНС организма является «кросс-реактивным». 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 в тимусе устраняет из репертуара клоны, специфичные к «своему» и оставляет все прочие, в числе которых будут присутствовать и ауторестриктированные и аллорестриктированные и кросс-реактивные (в чужом МНС-окружении). При встрече с «модифицированным своим» - чужеродным пептидом или пептидом эндогенного мутантного бел-

ка, презентированной 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 спектра специфичностей Т-клеточных рецепторов. В этом свете негативная селекция призвана адаптировать 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 становится объектом атаки быстро эволюционирующих патогенных микроорганизмов и злокачественно трансформированных клеток. В силу того, что молекулы МНС чрезвычайно полиморфны и их отдельные аллельные формы презентуют 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 рода «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 TCR, не влияющих на специфичность связывания пептидов и, тем не менее, придающих молекулам МНС аллоантигенные свойства [1, 43]. Смысл такого полиморфизма совершенно непонятен, если исходить из традиционных представлений об антигенпрезентирующей функции молекул 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 Т-клеток, способных ответить на пептиды патогена.

Очевидно, что первая и, возможно, наиболее важ-

ная 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 МНС-рестриктированному распознаванию формировалась не столько в борьбе с патогенными микроорганизмами, сколько в предотвращении реакций на «свое». Поэтому взаимодействия с собственными и чужеродными трансплантационными антигенами могут быть фундаментом, на котором строится адаптивный Т-клеточный иммунитет. Отчасти это находит подтверждение в наблюдении, что толерантность к «своему» является МНС-рестриктированной. Клон CTL 27.B2, полученный в ответе мышей *bm1* на стимуляторы B6, распознает один и тот же пептид в контексте аллогенной молекулы H-2K^b, но не сингенной молекулы H-2K^{bm1} [18]. Это соображение подкрепляется также сходством генетического контроля МНС-рестрикции и толерантности к «своему», наследование которых имеет кодоминантный характер.

Гипотеза, предложенная Эрне, разрешила загадку доминантного наследования аллоантигенности предсуществованием способности репертуара распознавать трансплантационные антигены, что заложено в самой структуре V-генов. Поразительно точное предвидение Эрне нашло прямое экспериментальное подтверждение в работе Церрана и Руле [66]. Открытие закономерностей презентации пептидов молекулами МНС показало, что спектры пептидов, которые презентуют аллельные формы молекул МНС, различаются [50]. Важность презентации широкого репертуара пептидов для развития интенсивного аллогенного ответа была показана в работе Ковалика и ван Каера [34]. Таким образом, сегодня можно утверждать, что высокая интенсивность аллогенного ответа объясняется двумя особенностями Т-клеточного распознавания: 1) генетически обусловленной способностью репертуара к взаимодействию со спектром молекул МНС вида; 2) специфичностью негативной селекции, сохраняющей способность репертуара ответить на пептиды, презентуемые в контексте аллогенных молекул МНС.

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 корцепторов [46, 47]. Оба типа показывают зависимость от avidности взаимодействий Т-клеток с АПК, хотя, по всей видимости, тимоциты имеют более низкий порог активации по сравнению со зрелыми периферическими Т-клетками [4, 55]. Позитивная селекция, очевидно, может быть аналогом периферических взаимодействий Т-клеток с собственными МНС, необходимыми для их выживания [63]. Негативная селекция в тимусе имеет явное сходство с периферической делецией Т-клеток в ответ на высокоаффинное связывание с эндогенными суперантигенами [13]. 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 [44]. 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 к трансплантационным антигенам вида эта вырожденность, по всей видимости, необходима для сохранения широкого спектра специфичности репертуара к патогенам, которые организм еще не встречал.

5. Благодарности

Автор считает своим долгом отметить, что отдельные положения высказанной гипотезы содержатся в целом ряде работ, инициированных идеями Эрне, а затем открытием Йенса Церрана и Давида Руле [26, 27, 29, 30, 63, 64].

Экспериментальные исследования автора, упомянутые в работе были бы невозможными без поддержки грантов РФФИ 02-04-49042 и 05-04-49793, а также программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего».

Список литературы

1. Казанский Д.Б., Побезинский Л.А., Терещенко Т.С. Мотивы в первичной структуре молекул МНС класса I и их использование для создания синтетических лигандов Т-клеточных рецепторов // Вестник РАМН.-2004.-N12.-С.25-32.
2. 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.- Vol.151.- N1.- P.1-10.
3. 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.- Vol.162.-N. 4.- P. 2008-2015.
4. 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.- Vol.76.-N4.-P. 651-663.
5. Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection // Front. Biosci.-1999.-Vol.4.- P. D476-480.
6. Benichou G., Valujskikh A., Heeger P.S. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice // J. Immunol.-1999.-Vol.162.-N1.-P. 352-358.
7. 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.-Vol.143.-P.1283-1288.
8. 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.-Vol.86.-P.219-223.
9. 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.-Vol.178.-N1.- P.27-47.
10. 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.-Vol.153.- N3.-P.938-945.
11. Benichou G., Fedoseyeva E.V. The contribution of peptides to T cell allorecognition and allograft

rejection // *Int. Rev. Immunol.*-1996.-Vol.13.-N3.-P.231-243.

12. 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.-Vol.167.-N4.-P.1891-1899.

13. 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.-Vol.155.-N11.-P.5115-5123.

14. Clark S.P., Arden B., Kabelitz D., Mak T.W. Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies // *Immunogenetics.*-1995.-Vol.42.-N6.-P.531-540.

15. 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.-Vol.55.-N12.-P.818-824.

16. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z., Lyons D., Hampl J., Arden B., and Chien Y.-h. Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptors // *Annu. Rev. Immunol.*-1998.-Vol.16.-P.523-544.

17. Eisen H.N. Specificity and degeneracy in antigen recognition: yin and yang in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*-2001.-Vol.19.-P.1-21.

18. Falk K., Rotzschke O., Rammensee H.G. A self peptide naturally presented by both H-2K^b and H-2K^b^{m1} molecules demonstrates MHC restriction of self tolerance at the molecular level // *Int. Immunol.*-1992.-Vol.4.-N3.-P.321-325.

19. Fischer Lindahl K., Wilson D.B. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes II. Estimates of frequency and specificity of precursors // *J. Exp. Med.*-1977.-Vol.145.-P.508-522.

20. 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.-Vol.21.-N2-3.-P.225-231.

21. Gould D.S., Auchincloss H. Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection // *Immunol. Today.*-1999.-Vol.20.-P.77-82.

22. 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.-Vol.151.-N8.-P.3981-3987.

23. Guillet M., Brouard S., Gagne K., Sebille F., Cuturi M.C., Delsuc M.A., Soullillou J.P. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction // *J. Immunol.*-2002.-Vol.168.-N10.-P.5088-5095.

24. 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.-Vol.88.-P.5101-5105.

25. 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.-Vol.163.-N6.-P.3217-3225.

26. 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.-Vol.100.-N20.-P.11565-11570.

27. Huseby E., Kappler J., Marrack P. TCR-MHC/peptide interactions: kissing-cousins or a shotgun wedding? // *Eur. J. Immunol.*-2004.-Vol.34.-N. 5.-P.1243-1250.

28. 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.-Vol.63.-N10.-P.912-925.

29. Janeway C.A., Chervonsky A.V., Sant'Angelo D. T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? // *Curr. Biol.*-1997.-Vol.7.-N5.-P.R299-300.

30. Jerne N.K. The somatic generation of immune recognition // *Eur. J. Immunol.*-1971.-Vol.1.-N1.-P.1-9.

31. 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.-Vol.25.-N2.-P.117-128.

32. 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.-Vol.32.-N4.-P.692-702.

33. de Koster H.S., van Rood J.J., Termijtellen A. HLA-DR peptide-induced alloreactive T cell lines reveal an HLA-DR sequence that can be both «dominant» and «cryptic»: evidence for allele-specific processing // *Eur. J. Immunol.*-1992.-Vol.22.-N6.-P.1531-1539.

34. 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.-Vol.165.-P.1285-1293.

35. 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.-Vol.97.-N2.-P.756-760.

36. 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.-Vol.62.-N7.-P.954-961.

37. Lobashevsky A, Kotb M, Gaber AO. Selective T cell receptor V β gene usage by alloreactive T cells responding to defined HLA-DR alleles // *Transplantation*.-1996.-Vol.62.-N9.-P.1332-1340.
38. 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.-Vol.8.-P.413-425.
39. 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.-Vol.100.-N4.-P.1861-1866.
40. Merckenschlager 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.
41. 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.-Vol.166.-N8.-P.4818-4821.
42. 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.-Vol.147.-P.1765-1772.
43. 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.-Vol.161.-N1.-P.148-153.
44. 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.-Vol.351.-N6326.-P.482-485.
45. 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.-Vol.137.-N5.-P.493-498.
46. 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.-Vol.179.-N2.-P.709-713.
47. 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.-Vol.186.-N11.-P.1911-1922.
48. Reimann J., Heeg K., Miller R.G., Wagner H. Alloreactive cytotoxic T cells. I. Alloreactive and allorestricted cytotoxic T cells // *Eur. J. Immunol*.-1985.-Vol.15.-N4.-P.387-393.
49. Reiser J.B., Darnault C., Guimezanes A., Grengoire 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.-Vol.1.-P.291-297.
50. 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.-Vol.348.-N6298.-P.252-254.
51. Rudensky A.Yu., Rath S., Preston-Hurlburt P., Murphy D.B., Janeway C.A. Jr. On the complexity of self // *Nature*.-1991.-Vol.353.-N6345.-P.660-662.
52. 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.-Vol.353.-N6345.-P.622-627.
53. 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.-Vol.86.-N21.-P.8516-8520.
54. 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.-Vol.56.-N1.-P.47-55.
55. 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.-Vol.263.-N5153.-P.1615-1618.
56. Sim B.C., Zerva L., Greene M.I., Gascoigne N.R. Control of MHC restriction by TCR Valpha CDR1 and CDR2 // *Science*.-1996.-Vol.273.-N5277.-P.963-966.
57. 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.-Vol.8.-N12.-P.701-704.
58. Smith P.A., Brunmark A., Jackson M.R., Potter T.A. Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL) // *J. Exp. Med*.-1997.-Vol.185.-P.1023-1033.
59. 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.-Vol.3.-P.573-582.
60. Tallquist M.D., Weaver A.J., Pease L.R. Degenerate recognition of alloantigenic peptides on a positive-selecting class I molecule // *J. Immunol*.-1998.-Vol.160.-N2.-P.802-809.

61. 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.-Vol.9.-N10.-P.1441-1452.

62. 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.-Vol.71.-N3.-P.418-421.

63. Viret C., Janeway C.A. Jr. MHC and T cell development // Rev. Immunogenet.-1999.-Vol.1.-N1.-P.91-104.

64. Whitelegg A., Barber L.D. The structural basis of T-cell allorecognition // Tissue Antigens.-2004.-Vol.63.-N2.-P.101-108.

65. Yang T.H., Lovatt M., Merckenschlager 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.-Vol.14.-N11.-P.1283-1290.

66. Zerrahn J., Held W., Raulet D.H. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection // Cell.-1997.-Vol.88.-P.627-636.

поступила в редакцию 23.05.2005

принята к печати 15.09.2005