

Иммунология

2

Издательство «Мир»

Fundamental Immunology

Editor William E. Paul, M. D.

**Laboratory of Immunology
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland**

Raven Press New York

Иммунология

Под редакцией У. Пола

В ТРЕХ ТОМАХ

Том 2

Перевод с английского
А. М. Бунцевича,
Т. В. Великодворской,
канд. биол. наук *А. А. Нейфаха,*
канд. хим. наук *В. А. Несмеянова,*
канд. биол. наук *А. Ю. Руденского,*
канд. биол. наук *А. С. Серпинской*

под редакцией
чл.-корр. АН СССР *Г. И. Абелева,*
д-ра биол. наук *Р. С. Незлина,*
д-ра биол. наук *Е. В. Сидоровой*



ББК 28.073

И53

УДК 575+57.083

Авторы:

Дэвид Г. Сакс, Томас Дж. Киндт, Мэри Энн Робинсон,
Р. Шварц, Уильям Е. Пол, П. Марк Хогарт, Ян Ф. Ц. Мак-
Кензи, Томия Тада, Джуди М. Тил, Норман Р. Климан,
Грегори В. В. Сяскинд, Кендалл А. Смит

Иммунология: В 3-х т. Т. 2. Пер. с англ./Под ред.
У. Пола. — М.: Мир, 1987—1988. 456 с., ил.

И53

ISBN 5-03-000497-1

Монография, написанная коллективом ведущих специалистов-иммунологов США. В т. 2 рассматриваются различные аспекты иммуногенетики и регуляции иммунного ответа.

Предназначена для научных работников—иммунологов, молекулярных биологов, вирусологов, биохимиков, медиков, а также студентов биологических и медицинских вузов.

И 2007020000—362
041(01)—88 подпис. изд.

ББК 28.073

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-000497-1 (русск.)

ISBN 0-89004-923-8 (англ.)

© 1984 by Raven Press Books, Ltd.

© перевод на русский язык, «Мир», 1988

Часть IV

Иммуногенетика

Глава 13

Главный комплекс гистосовместимости

Дэвид Г. Сакс

(David H. Sachs)

Аллотрансплантатом называют трансплантат ткани, взятый от одной особи данного биологического вида и привитый другой, генетически отличной особи того же вида. Было показано, что у каждого из изученных видов млекопитающих существует одна группа тесно сцепленных генетических локусов, имеющая решающее значение в определении судьбы аллотрансплантатов. Ввиду своей центральной роли в совместимости тканей эта группа локусов получила название *главный комплекс гистосовместимости* или сокращенно *МНС* (от англ. major histocompatibility complex). Помимо того что она контролирует иммунный ответ на аллотрансплантаты, данная группа тесно сцепленных локусов играет к тому же важнейшую роль в контроле клеточных взаимодействий, лежащих в основе физиологических иммунных реакций. Оказалось также, что гены, расположенные в пределах этой группы локусов или тесно сцепленные с ней, контролируют некоторые компоненты комплемента. Поэтому знание сущности *МНС*, его генетики, структуры и функции его продуктов имеет ключевое значение для изучения современной иммунологии.

Непосвященным терминология, используемая при описании генов и продуктов генов *МНС* различных биологических видов, представляется безнадежно запутанной. Отчасти это объясняется включением в *МНС* нескольких разновидностей генов, отличных друг от друга, а также множественностью функций, осуществляемых или контролируемых продуктами каждого из этих генов. Однако во многих случаях существующая путаница в большей степени обусловлена независимым историческим развитием терминологии для разных видов, чем генетическими особенностями *МНС*. К настоящему времени четко установлено, что различные классы генов *МНС* в значительной степени законсервированы у животных разных видов. Между тем номенклатуры, созданные для описания компонентов *МНС* двух наиболее детально изученных видов — человека (*HLA*) и мыши (*H-2*) — развивались по большей части независимо и совершенно различны. По-видимому, подобная ситуация могла бы возникнуть и в случае иммуноглобулинов, если бы исследователи, работавшие с иммуноглобулинами животных разных видов, не осознали сравнительно рано гомологичность изучаемых ими классов тяжелых и легких цепей и не приняли бы единой

номенклатуры. В противном случае для описания IgM, IgG, IgA, κ , λ и т. д. у различных биологических видов мы пользовались бы разными обозначениями. Предпочтительность единой номенклатуры очевидна, но поскольку исследования *МНС* различных видов продвинулись очень далеко независимо друг от друга, добиться общности терминологии становится все труднее. Очевидно, что назрело время компромиссов в этой области, и в течение ближайших нескольких лет успехи молекулярной биологии *МНС* несомненно выявят более точные межвидовые гомологии, повысив тем самым возможности создания единой номенклатуры. Пока, однако, для того чтобы пользоваться информацией о *МНС* двух видов (в частности, человека и мыши), необходимо знать обе номенклатуры.

Цель настоящей главы — познакомить читателя с основными иммуногенетическими концепциями, необходимыми для понимания *МНС*. Основное внимание по возможности уделяется общим характеристикам генетической организации и функциональным свойствам *МНС* различных видов. Основные инструменты и принципы исследования будут рассматриваться главным образом на модели *МНС* мыши; некоторые детали номенклатуры и современное состояние генетического картирования — на примере *МНС* мыши и человека. Вопросы молекулярной биологии генов *МНС* и биохимии продуктов *МНС* освещаются лишь на уровне принципиальных основ (общие сведения о *МНС* можно найти в специальных работах, приведенных в списке литературы к данной главе [1—11]).

13.1. Генетика гистосовместимости

13.1.1. Инбредные линии

Одна из основных особенностей мышинной модели, сделавшая ее столь ценной для генетических исследований, — это сравнительная легкость получения большого числа инбредных линий. Такие линии представлены генетически идентичными животными, т. е. животными, полученными в результате последовательных скрещиваний брат $\times$ сестра в течение по крайней мере 20 поколений. За исключением половых хромосом, все хромосомы у животных одной инбредной линии гомозиготны и дают начало идентичному гомозиготному потомству.

Положение о том, что последовательный инбридинг (скрещивание брат $\times$ сестра) приводит к гомозиготности, проиллюстрировано на рис. 13.1. Для простоты изложения в первом поколении представлено скрещивание брат $\times$ сестра, в котором любой конкретный аутосомный локус, по аллелям которого проводится отбор, имеет вид $AB \times AB$. Более общий случай AB и CD также можно статистически анализировать аналогичным, хотя и несколько более сложным математическим методом. Соотношение гаплотипов в потомстве от первого скрещивания определяется биномиальной формулой ($AA : AB : BB = 1 : 2 : 1$). Таким образом для поколения F_2 вероятность того, что оба животных в выбранной паре брат $\times$ сестра будут иметь генотип AA по интересующему нас локусу, составляет $1/16$. Вероятность того, что для скрещивания во второй генерации будет выбрана пара $BB \times BB$, также равна $1/16$. В любом из этих двух случаев во всех последующих поколениях сохранится гомозиготное состояние (AA или BB), и, следовательно, можно будет сказать, что данный локус фиксирован. Таким образом, вероятность фиксации любого конкретного аутосомного локуса в этом поколении равна $1/8$.

При сегрегации большого числа независимых локусов вероятность фиксации любого локуса с математической точки зрения эквивалентна $1/8$. Иными словами, в среднем $1/8$ всех сегрегирующих локусов будет фиксирована. Если интересующий нас локус не был фиксирован при таком случайном подборе пары, шансы на то, что он будет фиксирован в следующем поколении, остаются равными примерно $1/8$ (в действительности несколько выше). Другими словами, можно считать, что $1/8$ локусов будет фиксирована во втором инбредном

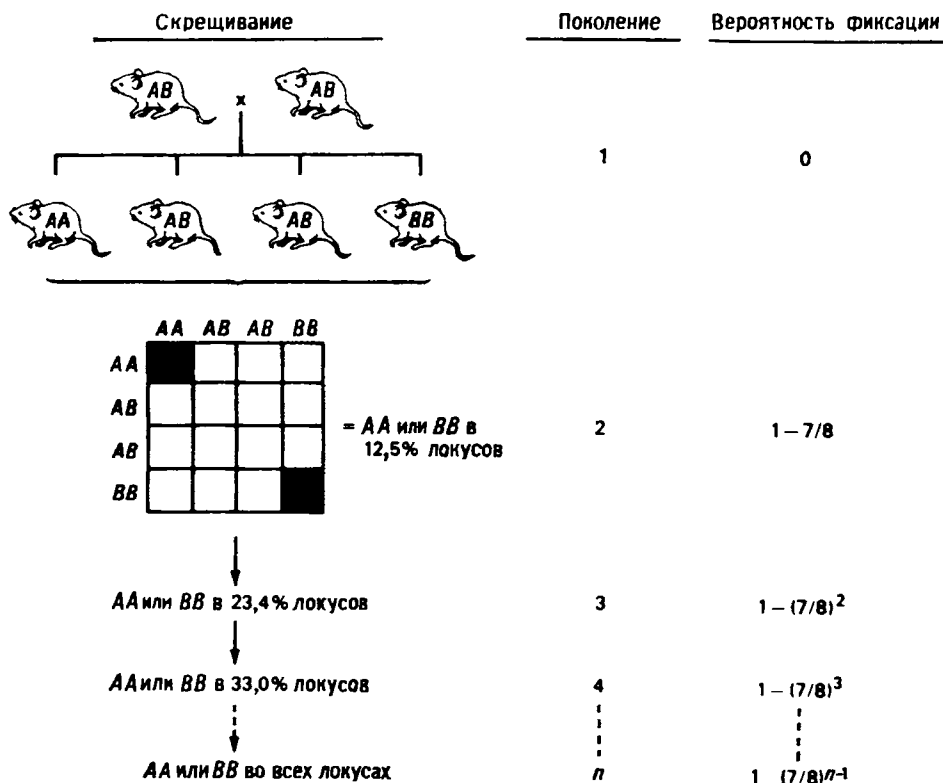


Рис. 13.1. Схема инбридинга.

Как показывает диаграмма, при случайном выборе пары брат $\times$ сестра в каждом из поколений любой аутосомный локус фиксируется в форме AA или BB с вероятностью $1/8$.

Другими словами, можно ожидать, что в результате каждого последовательного скрещивания брат $\times$ сестра $1/8$ независимо расщепляющихся локусов фиксируется в гомозиготной форме.

поколении, $1/8$ оставшихся незафиксированными локусов — в следующем поколении и т. д. Как показано на рис. 13.1, вероятность фиксации (P_{fix}) определяется формулой

$$P_{fix} = 1 - (7/8)^{n-1}$$

Эта зависимость описывается кривой, асимптотически приближающейся к вероятности 100%-ной фиксации (рис. 13.2). Поскольку при мейозе гены сегрегируют не индивидуально, а в основном группами, существует конечное число сегрегирующих единиц генетической информации. Поэтому на практике линию можно считать инбредной после 20 последовательных скрещиваний

брат $\times$ сестра, так как в это время вероятность того, что какой-либо локус не достиг состояния гомозиготности, пренебрежимо мала. Гетерозиготные формы локусов (AB) больше не будут встречаться, и все локусы будут иметь генотип AA или BB . Полученную таким образом линию называют *инбредной линией*.

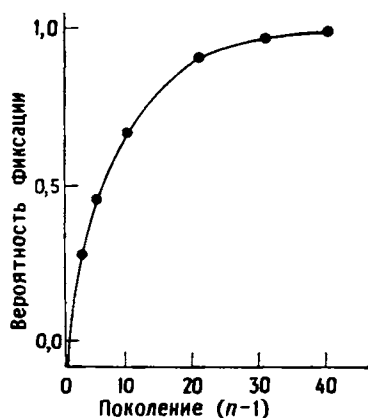


Рис. 13.2. Вероятность фиксации в гомозиготной форме всех локусов асимптотически приближается к единице согласно формуле $P = 1 - (7/8)^{n-1}$.

В настоящее время известны сотни подробно охарактеризованных инбредных линий; некоторые наиболее широко используемые линии приведены в табл. 13.1.

В процессе последовательных скрещиваний брат $\times$ сестра при выведении инбредных линий, как и следовало ожидать, многократно встречаются ситуации перехода рецессивных летальных генов в гомозиготное состояние, что

Таблица 13.1. Некоторые наиболее распространенные инбредные линии мышей

Обозначение линии	Употребляемое название	Окраска шерсти	Вариант Н-2	Вариант lgh-C
A	A	Белая	a	e
AKR	AKR	»	k	d
BALB/c	C	»	d	a
C3H	C3H	Агути	k	j
CBA	CBA	»	k	j
C57BL/6	B6	Черная	b	b
C57BL/10	B10	»	b	b
DBA/2	D2	Коричневая	d	c
SJL	SJL	Белая	s	d

приводит к потере соответствующей линии. Однако поскольку от одной пары можно получить последовательно много пар брат $\times$ сестра для дальнейшего инбридинга, из потомков одной пары аутбредных животных удастся, как правило, вывести по крайней мере несколько инбредных линий. К примеру, если провести все возможные варианты скрещиваний брат $\times$ сестра в первых двух или трех поколениях, а затем выбрать для последующих поколений лишь одну пару брат $\times$ сестра, можно легко получить 10 жизнеспособных инбредных линий, даже если 90% выводимых линий погибнут от присутствия рецессивных летальных генов. Достоинство такого подхода состоит в том, что при работе с мышами он дает возможность на небольшом пространстве содержать большое число линий. Выведены инбредные линии и у других видов, в том

числе и у кроликов. В случае более крупных животных выведение инбредных линий затрудняется необходимостью большего пространства, а также генетическими особенностями, такими, как длительность беременности, возраст половой зрелости и количество детенышей в помете.

Существует несколько обстоятельств, уменьшающих возможность получения истинно инбредных животных. Одно из них — это «вынужденная» гетерозиготность. Она возникает тогда, когда оба возможных аллеля данного локуса представляют собой рецессивные летали, так что жизнеспособными оказываются только гетерозиготы. В этом случае интересующий нас локус и тесно сцепленные с ним локусы будут поддерживаться в гетерозиготном состоянии. Такая ситуация, хотя теоретически и возможна, очевидно, встречается очень редко при выведении инбредных линий. Более распространенная проблема, возникающая при создании истинной гетерозиготности, связана с мутациями — неизбежным и непрерывно протекающим процессом. Согласно существующим оценкам, у млекопитающих средняя частота мутаций генов составляет примерно 10^{-6} /(локус·мейоз). Поскольку в организме млекопитающего имеется более 10^6 генетических локусов, в каждом новом поколении можно ожидать появления хотя бы одной мутации в каком-либо участке генома. Хотя феномен вторичной гетерозиготности неизбежен, можно с уверенностью сказать, что возникшая вторичная гетерозиготность не сохранится в потомстве в течение длительного времени, если поддержание линии проводится по схеме последовательных скрещиваний брат $\times$ сестра. Как показано, на рис. 13.1, такая схема обеспечивает либо потерю любой вновь возникшей мутации, либо ее фиксацию в гомозиготном состоянии. С тем чтобы убедиться, что инбредные линии действительно остаются инбредными, необходимо для каждой такой линии поддерживать «линии сравнения», имеющие общую с данной линией родословную (pedigreed reference lines). Для этого в каждом поколении выбирают одну пару брат $\times$ сестра и всех последующих животных линии получают либо от этой пары, либо от ее потомства. Животных, используемых в опытах в больших количествах, разводят в специальных расширенных колониях; при этом они не должны отдаляться от «линии сравнения» более чем на несколько поколений.

Если полученную инбредную линию поддерживать в двух различных колониях, в каждой из «линий сравнения» будут накапливаться различные мутации. Поэтому можно говорить, что в этих линиях имеет место генетический дрейф. Если в обеих колониях правильно ведется последовательное скрещивание брат $\times$ сестра, линии в каждой из колоний останутся истинно инбредными, но постепенно между ними будут накапливаться различия по ряду генетических локусов. Линии, поддерживаемые независимо, называют *сублиниями*; для их обозначения используют буквы, проставляемые после названия линии и указывающие общий источник и последующую колонию. Так, например, линии СЗН/Нез и СЗН/НеН являются сублиниями линии СЗН. Обе линии были получены Хестоном (Не); впоследствии одна сублиния поддерживалась в Джексонской лаборатории (СЗН/НеJ), а другая — в национальных институтах здоровья (СЗН/НеN). Хотя у этих линий сохраняется много общих свойств, между ними уже выявлено несколько различий — например, различная способность лимфоцитов реагировать на липополисахарид (ЛПС). Нередко различия между сублиниями впервые обнаруживаются по тому, что результаты, полученные в одной лаборатории, оказываются трудновоспроизводимыми в другой!

Отметим, что рассмотренные выше принципы создания и поддержания инбредных линий включают в себя случайный отбор полученной инбредным скрещиванием пары в каждом поколении (очевидно, отбор, случайный по всем параметрам, кроме пола). На самом деле селекция никогда не бывает строго

случайной. Например, лишь в редких случаях при выборе пары для следующего поколения исследователь не отдаст предпочтение наиболее здоровым на вид животным данного помета или же животным из помета большего размера. Другие, непредусмотренные факторы отбора, такие, как длина хвоста (создающая удобство при манипуляциях с животными в клетке) или менее агрессивный характер, также могут влиять на процесс селекции. При совершенно случайном подборе пары вероятность того, что мутация, возникшая у одного из партнеров, закрепится в будущих поколениях, составляла бы 25 %, а вероятность потери мутации и реверсии локуса в исходное гомозиготное состояние — 75 %. (Эти вероятности отражают сравнительную частоту мутантных аллелей и аллелей «дикого типа» в пуле генов при первом скрещивании.) Очевидно, что вероятность закрепления или потери мутации будет меняться под действием отбора. Наоборот, если необходимо закрепить локус до того, как он будет случайно фиксирован при инбридинге, это часто удается сделать путем избирательного инбридинга в течение всего лишь двух или трех генераций.

13.1.2. Генетика гистосовместимости

Самые первые линии инбредных мышей, подвергшиеся генетическому анализу, были созданы скорее для коммерческих, чем экспериментальных целей. Любители мышей в Европе и Японии многие годы стремились поддерживать в мышинных линиях целый ряд интересующих их особенностей, таких, как, например, окраска и характер поведения, и в процессе отбора по таким признакам они по существу провели инбридинг своих линий. В начале 1900-х годов экспериментаторы-онкологи заметили, что опухоли линейных животных часто можно успешно трансплантировать другим особям той же линии, в то время как подобные трансплантации между аутбредными животными, как правило, были безуспешными. Систематическое исследование этого феномена провели впоследствии Литл и Тайзер [12] в процессе создания и характеристики большого числа инбредных линий мышей.

Суммируя результаты исследований по трансплантации опухолей у мышей, Литл сформулировал основные генетические законы, определяющие совместимость тканей. Как много лет спустя отметил Медавар [13], первые онкологически-экспериментаторы, используя трансплантацию для изучения опухолей, на самом деле использовали опухоли для изучения феномена трансплантационного иммунитета. Дело в том, что на поверхности клеток опухоли в преобладающем количестве присутствуют такие же антигены, что и на нормальных клетках животного инбредной линии, у которого возникла опухоль. В связи с этим опухолевый трансплантат подвержен воздействию многих иммунологических реакций, происходящих при трансплантации нормальной ткани.

Пять законов трансплантации, сформулированные Литлом, приведены в табл. 13.2. Природа генов, лежащих в основе этих законов, тогда еще не была

Таблица 13.2. Законы трансплантации (печатается с разрешения Снелла и Стимпфлинга [14])

Трансплантаты в пределах инбредной линии приживаются
Трансплантаты между инбредными линиями отторгаются
Трансплантаты инбредной родительской линии приживаются на гибридах F_1 , но трансплантаты от гибрида F_1 родительской линии отторгаются
Трансплантаты гибридов F_2 и последующих поколений приживаются на гибридах F_1
Трансплантаты инбредных родительских линий приживаются лишь на некоторых гибридах F_2 и отторгаются у большинства реципиентов

до конца установлена. Однако в настоящее время уже ясно, что законы трансплантации представляют собой результат классического менделевского наследования множественных, независимо сегрегирующих генов тканевой совместимости (гистосовместимости). Гены гистосовместимости можно определить как гены, кодирующие такие структуры клеточной поверхности, которые, будучи полиморфны в пределах вида, достаточно иммуногенны для индукции реакции отторжения. Эти гены почти всегда экспрессированы кодоминантно, т. е., если ген унаследован хотя бы от одного из родителей, его продукт будет экспрессирован на клеточной поверхности. Поэтому если у реципиента отсутствует ген гистосовместимости, имеющийся у донора, происходит отторжение трансплантата. Поскольку гибриды F_1 получают по одному набору всех генов от каждого из родителей, следует ожидать, что трансплантаты от родителей будут приживаться у животных F_1 . Аналогичным образом остальные законы трансплантации можно легко вывести из менделевского наследования множественных аутосомных генов гистосовместимости.

13.1.3. Оценка числа генов гистосовместимости

Имея в распоряжении инбредные линии и учитывая вышеизложенные генетические принципы, можно экспериментально определить число локусов гистосовместимости, по которым различаются две данные линии. Для этого разводят большую популяцию гибридов F_2 и трансплантируют всем животным F_2 ткань

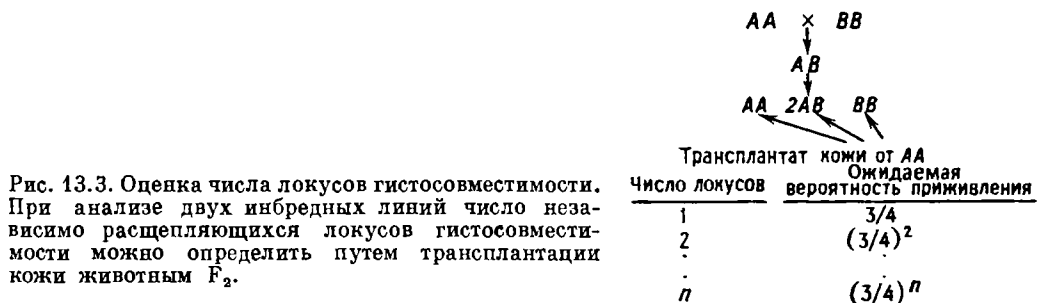


Рис. 13.3. Оценка числа локусов гистосовместимости. При анализе двух инбредных линий число независимо расщепляющихся локусов гистосовместимости можно определить путем трансплантации кожи животным F_2 .

одной из родительских линий, после чего определяют долю прижившихся трансплантатов. Если две линии различаются только по одному локусу гистосовместимости, можно ожидать приживления $3/4$ от общего числа трансплантатов (рис. 13.3). Если же две линии различаются по двум независимо сегрегирующим локусам гистосовместимости, ожидаемая доля прижившихся трансплантатов составляет $(3/4)^2$, поскольку из $3/4$ животных, не отторгнувших трансплантат благодаря совместимости по первому локусу, лишь у $3/4$ можно ожидать совместимость по второму локусу. Аналогичным образом, если две линии различаются по n локусам, ожидаемая доля прижившихся трансплантатов составит $(3/4)^n$.

В первоначальных экспериментах по определению числа локусов гистосовместимости использовались опухолевые трансплантаты. Число выявляемых локусов колебалось от 4 до 10; полученные результаты в значительной степени зависели от конкретного выбора родительских линий и опухолей, использованных для трансплантации. Впоследствии эти эксперименты повторили, применяя в качестве трансплантатов лоскуты кожи. В этом случае число выявляемых локусов возросло до 30—35 [15, 16]. Поскольку геном мыши представлен всего двадцатью парами хромосом, такие большие числа указывают, что многие хромосомы имеют более одного локуса гистосовместимости.

Представляется поучительным рассмотреть возможные причины различий в оценке числа локусов гистосовместимости. Очевидно, такая оценка зависит от ряда факторов, связанных с постановкой эксперимента. Например, число потенциально выявляемых локусов зависит от числа локусов, по которым вообще различаются две анализируемые линии. По-видимому, различия по какому-либо локусу, обнаруживаемые при анализе одной пары линий, могут не проявиться при анализе другой пары. Таким образом, полученное число всегда представляет собой заниженную оценку реального количества локусов гистосовместимости исследуемого биологического вида. Другой важный фактор — выбор ткани для трансплантации. При трансплантации опухолевой ткани число выявляемых локусов было меньше, чем при трансплантации кожи. Отчасти это можно было объяснить спектром антигенов, экспрессированных на опухолевых клетках, поскольку если локус не экспрессируется в пределах конкретной ткани, то нельзя ожидать, что различия по нему приведут к отторжению трансплантата этой ткани. Более важное значение, однако, имеет различие критериев оценки результатов при трансплантации опухоли и трансплантации кожи. Успешная трансплантация опухоли приводит к деструкции органов и тканей реципиента и в конечном счете к его гибели. В случае многих опухолей такое завершение опыта наступает сравнительно быстро — часто в течение 10—20 дней после прививки. Поэтому локус, несовместимость по которому вызывает позднее или медленное отторжение, очевидно, не будет обнаружен в таком эксперименте, так как несовместимость не приведет к отторжению трансплантата опухоли. Тем не менее несовместимость по этому локусу может вызвать отторжение кожного трансплантата, хотя и после длительного интервала времени. В самом деле, существуют локусы гистосовместимости, различия по которым допускают очень длительное, хотя и не бесконечное выживание трансплантата; зачастую отторжение наблюдается в такие поздние сроки, как 20, 30 или даже 110 дней. Эти локусы можно выявить методом трансплантации кожи, но не трансплантацией агрессивных опухолей.

Итак, существует очень много локусов гистосовместимости; каждый из них кодирует определенную молекулу клеточной поверхности, способную обусловить отторжение трансплантата. Отсюда можно прийти к выводу о невозможности применения трансплантационного теста в клинических целях, поскольку практически невозможно подобрать пару индивидов, идентичных по всем локусам гистосовместимости. Однако, как отмечалось в начале этой главы, в любом из изученных сегодня видов млекопитающих решающую роль в определении судьбы аллотрансплантата играет один основной локус: главный комплекс гистосовместимости (*МНС*). Остальные локусы, выявляемые в экспериментах по трансплантации кожи, обычно относят к категории слабых локусов гистосовместимости. Если две линии различаются по большому числу слабых локусов, то нередко отторжение трансплантата протекает так же быстро, как при различии по антигенам главного локуса. Как правило, каждый слабый локус сам по себе может индуцировать отторжение лишь после длительного срока выживания трансплантата. Далее в настоящей главе будет показано, что последний факт играет большую роль в клинике трансплантации почки, поскольку, если донор и реципиент совместимы по главному локусу (как это может быть в пределах одной семьи), то длительность жизни трансплантата бывает очень большой. Если же, наоборот, не удастся подобрать донора, совместимого по *МНС*, то трансплантация между членами семьи, несовместимыми по *МНС*, дает практически не лучшие результаты, чем трансплантация трупных органов, не подобранных по гистосовместимости. Трансплантация все же бывает успешной у 50—60% реципиентов, но даже в этих случаях необходимы повышенные дозы

иммунодепрессантов, причем сопутствующая клиническая картина часто бывает тяжелой.

По-видимому, любая молекула клеточной поверхности, полиморфная в пределах вида (т. е. имеющая более одной аллельной формы), может стимулировать отторжение трансплантата. Вероятно, многие из таких молекул имеют мало общего с физиологическими системами иммунитета, они могут варьировать по аллотипическому принципу, случайно или ввиду селективных преимуществ, связанных с их физиологической функцией. Путем соответствующей иммунизации против таких малых факторов различия (например, с помощью трансплантации кожи) можно добиться, чтобы животное начало определять эти отличительные факторы как антигены и реагировать на них. С другой стороны, выраженный полиморфизм и высокая антигенность *МНС* наводят на мысль, что физиологическая роль продуктов этого локуса распространяется на деятельность иммунной системы в целом. Как будет показано далее в этой главе и других главах настоящей книги, молекулы *МНС* участвуют в реализации множества иммунологических функций. Поскольку многие из последних включают в себя взаимодействие клеточных поверхностей, легко можно представить аллореактивность, индуцируемую локусом *МНС*, как следствие нормальных физиологических иммунных механизмов, созданных для узнавания молекул *МНС* или для выявления изменений в этих молекулах. Конечно, *МНС* могут быть присущи и другие важные физиологические функции, не связанные с системой иммунитета.

13.2. Отличительные признаки *МНС*

13.2.1. Свойства, связанные с *МНС*

Как отмечалось ранее, у любого из изученных видов млекопитающих главный комплекс гистосовместимости играет доминирующую роль в определении судьбы аллотрансплантата. Слова «главный» и «гистосовместимости» отражают важную роль этой генетической области в отторжении аллотрансплантата; слово «комплекс» отражает тот факт, что *МНС* состоит из множества тесно сцепленных

Таблица 13.3. Связанные с *МНС* иммунологические свойства

Интенсивное отторжение трансплантатов тканей
Стимуляция образования антител
Стимуляция реакции в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ)
Реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ)
Клеточная реакция лимфолиза (КРЛ, СМЛ)
Гены иммунного ответа (<i>I</i> _r)
Рестрикция иммунного ответа

локусов, выполняющих различные функции. Некоторые основные функциональные особенности, связанные с *МНС* у животных различных видов, перечислены в табл. 13.3. В последующих разделах мы более детально рассмотрим каждую из этих особенностей.

13.2.1.1. Сильная реакция отторжения трансплантата

При пересадке кожи и большинства других тканей или органов реципиенту, не совместимому с донором по *МНС*, система иммунитета осуществляет быструю и полную деструкцию трансплантата. Период времени, необходимый для

завершения отторжения, бывает различным в зависимости от конкретной ткани или органа. В целом можно сказать, что при несовместимости по *MHC* отторжение наступает, как только физиологические возможности организма позволяют реализовать иммунные взаимодействия, необходимые для сенсибилизации и отторжения (например, от 7 до 11 дней для трансплантатов кожи у некоторых видов млекопитающих). В этом аспекте термины «слабый» (minor) и «главный» (major) локусы гистосовместимости имеют относительный смысл. Животные, идентичные по аллелям *MHC*, но различающиеся по большому числу слабых локусов гистосовместимости, также будут энергично отторгать трансплантат, и поскольку скорость, с которой может протекать весь процесс отторжения, лимитирована физиологическими возможностями, в некоторых случаях различия по множеству слабых локусов могут вызвать почти столь же быстрое отторжение, как и различия по главному локусу. Однако, как правило, различия по отдельным слабым локусам влекут за собой гораздо более вялый процесс отторжения. К тому же несовместимость по слабым локусам часто можно преодолеть с помощью минимальных иммунодепрессивных воздействий, тогда как подавление процесса отторжения, обусловленного несовместимостью по главному локусу, требует гораздо более агрессивной иммунодепрессивной терапии.

В клинических условиях подбор идентичной по *MHC* пары донор — реципиент приводит к замечательным результатам. Реципиенты почки от идентичного по *HLA* sibса, как правило, нуждаются в минимальной иммунодепрессивной терапии, сравнительно коротком стационарном лечении и быстро возвращаются к нормальной жизни. В самом деле, описаны случаи, когда реципиенты почки от совместимого по *HLA* sibса безболезненно для себя прекращали иммунодепрессивную терапию, хотя до сих пор снятие иммунодепрессии в таких случаях не рекомендуется. Гораздо более тяжелое клиническое течение наблюдается у больных, получивших трансплантат от несовместимых по *HLA* sibсов, родителей или других доноров. Для подавления реакции отторжения требуются более высокие дозы иммунодепрессантов, у больных повышена частота случаев отторжения и периодов стационарного лечения, одновременно снижена вероятность пятилетней выживаемости трансплантата. Очевидно, *HLA*-идентичные sibсы различаются между собой по многим слабым локусам гистосовместимости, но эффект этих различий легко преодолеть.

Иммунологические и физиологические основы процесса отторжения — сложный и не до конца исследованный вопрос. В принципе не существует очевидных физиологических барьеров для аллотрансплантации (и во многих случаях для ксенотрансплантации). В начальной стадии организм реципиента принимает аллотрансплантат и вовлекает его в процессы заживления раны так же, как и аутоотрансплантат или изотрансплантат (соответственно трансплантат ткани, взятой у самого реципиента или у генетически идентичной особи). В течение нескольких последующих дней осуществляется сенсибилизирующее звено иммунной реакции. В зависимости от особенностей трансплантата процесс может происходить в нем самом (контакт циркулирующих иммунных клеток с чужеродной тканью, как в случае аллотрансплантата почки или сердца) или в дренирующей трансплантат лимфоузлах (в результате захвата антигенов или клеток, поступающих из трансплантата). В обоих случаях возможен также процесс инфильтрации трансплантата клетками хозяина с последующим возвращением таких клеток в лимфоидные органы. После этого первичного контакта с антигеном происходит пролиферация и, вероятно, также дифференцировка сенсибилизированных клеток. В результате возникает большое количество лимфоидных клеток, способных специфически узнавать чужие антигены гистосовместимости и реагировать против них. К тому же в ходе этого процесса пролиферации

формируются клетки памяти, способные в будущем узнавать соответствующие антигены и благодаря этому индуцировать ускоренную реакцию отторжения при повторной трансплантации от того же донора или донора с аналогичными антигенами гистосовместимости (вторичное отторжение трансплантата).

Другое звено реакции отторжения, эффекторное звено, также изучено неполно. Гистологическими методами можно наблюдать проникновение в трансплантат иммунных клеток, являющихся, по-видимому, частью популяции иммуноцитов, генерированных на стадии сенсibilизации. В случае трансплантатов кожи на границе между ложем трансплантата и тканью донора образуются массивный инфильтрат, содержащий лимфоидный компонент, а также фагоцитирующие клетки, реагирующие на происходящую в это время деструкцию ткани. Сосудистые связи прерываются, и трансплантат некротизируется и слущивается. В процессе отторжения эффекторные лимфоидные клетки выделяют многочисленные растворимые факторы; эти факторы и медиаторы также играют роль в отторжении, усиливая воспалительную реакцию. В случае трансплантатов органов эффекторные клетки вначале появляются вокруг капилляров, через которые, по-видимому, они мигрируют, создавая периваскулярные инфильтраты. Принято считать, что при этом выделяются медиаторы, повышающие проницаемость сосудов и привлекающие различные другие клетки воспаления из организма реципиента. Как и в предыдущем случае, конечным результатом этих процессов являются сосудистый стаз и некроз трансплантированного органа.

13.2.1.2. Образование антител

После отторжения несовместимого по МНС трансплантата ткани в сыворотке реципиента появляются антитела, способные реагировать с МНС-продуктами на клетках донора. Гуморальный ответ протекает, как правило, быстро и интенсивно, он включает в себя как раннюю (выработка IgM), так и позднюю (выработка IgG) фазы. Хотя антитела могут вырабатываться не только против МНС-продуктов, но и против других антигенов гистосовместимости, для индукции антителообразования против антигенов последних типов нередко требуются специальные методы иммунизации, например введение взвеси ткани в виде эмульсии с полным адъювантом Фрейнда. Поэтому индукция активного синтеза антител в результате обычной трансплантации представляет собой отличительную особенность МНС.

Рассматривая вопрос с практической точки зрения, следует отметить, что это свойство МНС открывает возможности для типирования тканей в аутобредных популяциях, в частности, у человека. При родах клетки плода, очевидно, проникают через плацентарные мембраны в количествах, достаточных для сенсibilизации матери. Поэтому многорожавшие женщины часто имеют существенный контакт с находящимися на клетках плода антигенами отца. В самом деле, серология системы HLA человека была разработана главным образом благодаря использованию сывороток многорожавших женщин. В начале 60-х годов во многих странах началось осуществление больших программ скрининга с использованием этих сывороток, и выявленные особенности реакций сывороток, тестируемых на панелях лимфоидных клеток, послужили основой для формирования современных представлений о системе HLA. Если бы гуморальный ответ на клетки плода включал в себя выработку антител против множественных слабых антигенов, параметры реакций сывороток были бы очень запутанными и из такого комплекса было бы трудно вычленить специфические реакции против HLA.

Существует целый ряд методов, позволяющих определять антитела против антигенов МНС. У мыши некоторые антигены МНС выявляются на эритроцитах так же успешно, как и на лимфоидных клетках. Поэтому в ранних работах для серологического определения специфичностей H-2 использовали тест гемагглютинации. Антигены HLA не обнаруживаются на эритроцитах человека, но легко выявляются на лейкоцитах. Поэтому вначале при типировании HLA использовали метод, известный под названием *лейкоагглютинации*. Тем не менее в настоящее время для изучения антигенов обоих видов чаще всего используется метод комплементзависимой цитотоксичности. Сущность метода состоит в следующем: лимфоидные клетки инкубируют с разными разведениями аллоиммунных сывороток, а затем с комплементом. Если антиген, выявляемый сывороткой, присутствует на поверхности клетки, происходит опосредованный комплементом цитоллиз и гибель клетки можно определить микроскопически (по включению витального красителя) или по выходу из предварительно меченой клетки радиоактивного хрома (^{51}Cr).

Выявляемые при серологическом анализе каждой системы МНС индивидуальные специфичности обозначали последовательными цифрами. Для получения аллоиммунных сывороток у мышей инбредных линий существуют стандартные схемы иммунизации; индивидуальные специфичности можно определять с большой точностью, а результаты легко воспроизводимы в разных лабораториях. С другой стороны, при изучении МНС человека понадобилась серия рабочих совещаний, чтобы по результатам тестирования больших популяций выявить общность между серологическими специфичностями, определяемыми в разных лабораториях. Ввиду большого разнообразия антигенов МНС известно очень много доступных для определения специфичностей, каждой из которых присвоен свой номер. Проблема серологических специфичностей будет детально изложена в последующих разделах настоящей главы.

13.2.13. Реакция в смешанной культуре лимфоцитов

Если поместить в культуральные условия смесь лимфоидных клеток от животных одного вида, но различного генотипа, происходит реакция, известная как реакция смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Лимфоидные клетки каждого из доноров стимулируются лимфоидными клетками другого донора и трансформируются в бласты. Бласт-трансформацию можно наблюдать либо визуально, по появлению больших пиронинофильных клеток, либо по увеличению синтеза ДНК, определяя включение ^3H -тимидина; последний метод используется шире. Исследования на животных различных видов показали, что способность стимулировать реакцию СКЛ непосредственно связана с несовместимостью по МНС. Генетические основы этой реакции можно анализировать, если одна из двух популяций будет не способна к бласт-трансформации. С этой целью клетки обрабатывают ингибиторами метаболизма, например митомицином С, или облучают дозой около 2000 рад; можно также использовать в качестве стимуляторов клетки гибридов F_1 , которые, как указывалось ранее, не способны реагировать на МНС родителей. У человека при постановке реакции СКЛ между членами семьи стимуляция наблюдается во всех возможных сочетаниях, если, согласно данным серологического типирования, они несовместимы по аллелям МНС. Оказалось, что у мыши есть один локус вне МНС (локус *Mls*), несовместимость по которому индуцирует реакцию СКЛ. По-видимому, этот локус гораздо менее полиморфен, чем МНС; аналога этого локуса у других млекопитающих не найдено.

13.2.1.4. Реакция трансплантат против хозяина

Если ввести иммунокомпетентные клетки реципиенту, отличающемуся от донора по трансплантационным антигенам, но не способному к отторжению этих клеток, они могут реагировать на антигены реципиента и вызывать процесс, называемый реакцией «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Реципиент может не отторгать трансплантат по различным причинам. Отметим следующие из них: а) иммунодепрессия в результате облучения или химиотерапии, б) незрелость иммунной системы; так, новорожденные животные, иммунная система которых еще не достигла полного развития, более чувствительны к РТПХ, чем взрослые, в) генетически детерминированная ареактивность, такая, например, как неспособность гибридов F_1 отторгать трансплантаты от родителей.

РТПХ инициируется реактивностью трансплантированных иммунокомпетентных клеток, направленной против антигенов гистосовместимости реципиента (хозяина). Однако эта реакция, несомненно, вовлекает также компоненты иммунной системы хозяина. Клинические проявления реакции — это гипертрофия целого ряда гемопоэтических и лимфопоэтических тканей, кожная сыпь, кишечные расстройства и другие симптомы аллергического характера. Нередко считают, что РТПХ является аналогом *in vivo* описанной ранее реакции СКЛ.

Хотя наиболее сильным стимулятором РТПХ является несовместимость по *MHC*, другие локусы гистосовместимости также способны вызывать эту реакцию. Именно ввиду последней причины РТПХ остается главной помехой на пути трансплантации костного мозга у человека, даже если донор и реципиент являются сибсами, идентичными по *HLA*.

13.2.1.5. Клеточная реакция аллогенного лимфолиза

В результате реакции СКЛ *in vitro* в стимулированной популяции респондеров появляются сенсibilизированные лимфоидные клетки, способные убивать мишени, аналогичные клеткам-стимуляторам. Это киллерное действие осуществляется эффекторными цитотоксическими Т-лимфоцитами; феномен получил название *клеточной реакции лимфолиза* (cell-mediated lympholysis; CML, КРЛ). Уровень цитотоксической реакции определяют *in vitro*, смешивая цитотоксические эффекторные Т-клетки с мечеными хромом клетками-мишенями, имеющими соответствующий тип *MHC*. Через 4—6 ч после начала литической реакции определяют количество хрома, выделившегося из лизированных клеток-мишеней. Клеточную реакцию лимфолиза принято считать аналогом *in vitro* одного из эффекторных механизмов отторжения трансплантата.

13.2.1.6. Связь с генами иммунного ответа

Гены иммунного ответа (*Ir* — от англ. immune response) — это гены, контролирующие способность животного реагировать на определенные антигены. Вначале была обнаружена роль этих генов в гуморальном ответе на некоторые синтетические полимеры аминокислот; впоследствии оказалось, что гены иммунного ответа участвуют в контроле клеточных и гуморальных иммунных реакций на широкий спектр антигенов, как синтетических, так и природных. Для многих видов млекопитающих показано генетическое сцепление этих генов с *MHC*. Вопрос о генах *Ir* и иммунологических механизмах их действия подробно изложен в гл. 16.

13.2.1.7. Рестрикция иммунного ответа

Помимо характерных проявлений в аллогенных реакциях антигены МНС также участвуют в физиологических взаимодействиях элементов иммунной системы индивидуального организма. Недавно выяснилось, что иммунная система узнает многие чужеродные антигены в сочетании (комплексе) со своими продуктами МНС. Например, если лимфоидные клетки сенсibilизировать чужеродным антигеном, прикрепленным к поверхности клеток или экспрессированным на них, а затем смешать их с такими же мишенями, происходит реакция, аналогичная КРЛ. Пример такой реакции приведен на рис. 13.4: в результате контакта клеток животного А с вирусом V_1 генерируются цитотоксические Т-лимфоциты, способные убивать клетки-мишени А- V_1 . Такие эффекторы не убивают лимфоидных клеток другого животного, модифицированных тем же вирусом (В- V_1), а также не убивают свои клетки, модифицированные другим вирусом (А- V_2).

Создается впечатление, что антигены МНС очень важны в таких реакциях; роль этих антигенов заключается, по-видимому, в том, что реагирующие на чужеродный антиген клетки распознают их как «свои» детерминанты. Поскольку генотип МНС клеток-мишеней лимитирует узнавание, феномен получил название МНС-рестрикция. Рестрикция иммунной реактивности проявляется как на уровне сенсibilизации Т-хелперов чужеродным антигеном, так и на уровне цитотоксического действия эффекторных Т-клеток против вирусов и химических агентов, модифицирующих антигены клеточной мембраны.

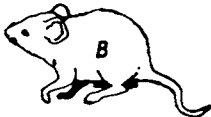
Источник эффекторных клеток		Клетки-мишени	Цитотоксический эффект
Реципиент	Вирус		
	V_1	Ⓐ	—
		Ⓐ- V_1	+
		Ⓐ- V_2	—
		В- V_1	—
		В- V_2	—
	V_2	Ⓐ- V_1	—
		Ⓐ- V_2	+
		В- V_2	—
	V_1	Ⓐ- V_1	—
		В- V_1	+
		В- V_2	—

Рис. 13.4. Рестрикция опосредованного клетками лимфолиза. Реципиент А «узнает» вирус V_1 только в случае, если вирус пред-

ставлен на клетках-мишенях, МНС которых идентичен МНС реципиента.

Распознавание модифицированных «своих» антигенов МНС, может быть, объяснит биологическую целесообразность существования этих антигенов. Феномены МНС-рестриктированной реактивности детально рассматриваются в гл. 4, 11, 15 и 25.

13.2.2. МНС различных видов животных

У разных видов млекопитающих обнаружен локус, имеющий многие, если не все, из перечисленных выше характерных свойств МНС. В силу исторических причин в номенклатуре этих локусов нет единообразия. В табл. 13.4 приведены обозначения локусов МНС некоторых исследованных видов.

Таблица 13.4. Номенклатура МНС некоторых видов млекопитающих

Вид	Обозначение МНС	Вид	Обозначение МНС
Шимпанзе	<i>ChLA</i>	Свинья	<i>SLA</i>
Собака	<i>DLA</i>	Кролик	<i>RLA</i>
Морская свинка	<i>GPLA</i>	Крыса	<i>RT1</i>
Человек	<i>HLA</i>	Макак-резус	<i>RhLA</i>
Мышь	<i>H-2</i>		

МНС мыши был назван H-2 потому, что хронологически он был вторым из серии антигенов гистосовместимости, определенных Горером (Gorer) в ранних серологических исследованиях [17]. Для обозначения МНС крысы обычно использовали одно из двух названий — Ag-B и H-1, недавно они были заменены новым термином — RT1 [18]. Как показано в табл. 13.4, для большинства других животных исследователи предпочли терминологию, близкую к терминологии МНС человека (HLA).

13.2.3. Локусы класса I и II

В конце 60-х годов стало очевидно, что многие свойства, связанные с МНС мыши и человека, не являются генетически неделимыми и благодаря рекомбинациям (хотя и редким) могут быть локализованы в разных участках генетической карты. Серологически определяемые антигены клеточной поверхности картировались отдельно от антигенов, вызывающих стимуляцию СКЛ. Поэтому для дискриминации этих классов антигенов, отличающихся друг от друга у мыши и человека (и, вероятно, у других видов), были предложены термины «серологически определяемые» (serologically defined; SD) и «определяемые лимфоцитами» (lymphocyte defined; LD) антигены [19]. Впоследствии стало ясно, что детерминанты, вызывающие стимуляцию СКЛ, также выявляются серологически (как антигены Ia), и обозначения SD и LD оказывались неточными. В настоящее время общепринято подразделять антигены МНС на антигены класса I и II, причем класс I включает в себя антигены, которые раньше относились к группе SD, а класс II — стимулирующие СКЛ детерминанты и/или антигены Ia. Многие черты МНС, как показано в табл. 13.5, свойственны в большей степени одному или другому классу, хотя очевидно, что в той или иной мере некоторые качества характерны для обоих классов.

Как видно из табл. 13.5, помимо серологических и функциональных различий продукты локусов класса I и II различаются по биохимической структуре

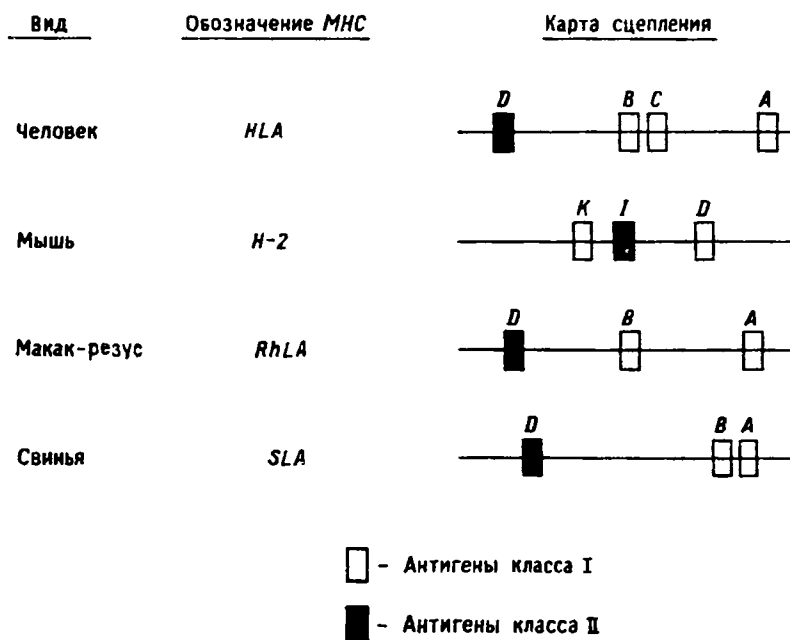


Рис. 13.5. Схема организации локусов, кодирующих антигены класса I и антигены класса II у человека и некоторых видов животных.

На диаграмме не отражено подразделение локусов класса II на множественные тесно сцепленные локусы (см. текст).

и, следовательно, являются производными разных родоначальных генов (primordial gene). Во всех известных случаях локусы класса I и II представляют собой семейства генов, тесно сцепленных в *МНС* и выполняющих аналогичные функции у животных разных видов. Хотя локусы класса I, как и локусы класса II, у животных всех изученных видов имеют много общего, линейное расположение локусов неодинаково у различных видов (рис. 13.5).

Другие локусы, расположенные дистальнее *МНС* относительно центромеры, такие, как *Tl* и *Q*, также можно было бы включить в группу локусов

Таблица 13.5. Связь между свойствами *МНС* и классами локусов

Свойство	Локусы класса I	Локусы класса II
Интенсивное отторжение	+++++	++
Образование антител	+++++	+++++
Стимуляция СКЛ	+	+++++
Реакция РТПХ	++	+++++
<i>СМЛ</i>	+++++	+
Гены <i>Iγ</i>	+	+++++
Уровень рестрикции	Лизис клеток-мишеней	Антиген-презентирующие клетки
Распределение по тканям	Повсеместное	Преимущественно В-клетки и макрофаги
Химическая структура	Гликопротеин 45 000 Да + β_2 -микроглобулин	Гликопротеины 35 000 и 28 000 Да

класса I. Однако продукты этих локусов различаются по серологическим и функциональным свойствам. Поэтому остается неясным, следует ли относить эти локусы к классу I, хотя, вероятно, многие из них являются потомками общих генов-предшественников. В настоящей главе для удобства изложения мы будем придерживаться определения локусов класса I и II, основанного на иммунологических и биохимических параметрах, указанных в табл. 13.5. Термины «класс III» и «класс IV», употребляемые с недавних пор для описания некоторых других локусов, сцепленных с *MHC* [20], не будут использоваться в этой главе.

13.3. Конгенные по *MHC* и конгенные рекомбинантные линии

13.3.1. Принципы создания конгенной линии

Конгенными называют инбредные линии, полученные таким подбором родительских пар, при котором выведенные линии отличаются друг от друга лишь по одному независимо расщепляющемуся генетическому локусу. Конгенные резистентные (КР) линии — это линии, различающиеся по локусу гистосовместимости. В этом термине нашел отражение тот факт, что, с одной стороны, линии конгенны, а с другой — животные одной линии отторгают трансплантат опухоли другой линии, и наоборот; между прочим, именно на этой основе и было создано большинство первых КР-линий. В настоящее время существует много КР-линий по локусу *H-2* (табл. 13.6). Именно в процессе создания таких линий были получены многочисленные интра-*H-2*-рекомбинанты. Таким образом, работы по получению и исследованию *H-2*-конгенных линий внесли, вероятно, большой вклад в выяснение тонкой генетической структуры *MHC*.

Таблица 13.6. Некоторые группы нерекомбинантных линий, конгенных по локусу *H-2*, имеющих одинаковый базовый генотип (по Кляйну [22]).

Линия ¹	Гаплогенотип <i>H-2</i>	Линия, из которой происходит		Линия ¹	Гаплогенотип <i>H-2</i>	Линия, из которой происходит	
		базовый генотип	<i>MHC</i>			базовый генотип	<i>MHC</i>
A	<i>a</i>	A	—	B10.K	<i>k</i>	C57BL/10	CBA
A.BY	<i>b</i>	A	Bradyury	B10.AKM	<i>m</i>	C57BL/10	AKR.M
A.D ²	<i>d</i>	A.BY	B10.D2	B10.P	<i>p</i>	C57BL/10	P
A.CA	<i>f</i>	A	Caracal	B10.Q	<i>q</i>	C57BL/10	DBA/1
A.K ²	<i>k</i>	A.BY	B10.BR	B10.R	<i>r</i>	C57BL/10	RIII
A.SW	<i>s</i>	A	Swiss	B10.S	<i>s</i>	C57BL/10	A.SW
BALB/c	<i>d</i>	BALB/c	BALB/c	B10.PL	<i>u</i>	C57BL/10	PL/J
BALB.B	<i>b</i>	BALB/c	C57BL/10	C3H	<i>k</i>	C3H	C3H
BALB.K	<i>k</i>	BALB/c	C3H	C3H.A	<i>a</i>	C3H	A
B10	<i>b</i>	C57BL/10	C57BL/10	C3H.SW	<i>b</i>	C3H	Swiss
B10.A	<i>a</i>	C57BL/10	A	C3H.B10	<i>b</i>	C3H	C57BL/10
B10.D2	<i>d</i>	C57BL/10	DBA/2	C3H.D	<i>d</i>	C3H	DBA/2
B10.M	<i>f</i>	C57BL/10	Outbred	C3H.RIII	<i>r</i>	C3H	RIII
B10.BR	<i>k</i>	C57BL/10	C57BR				

¹ Список лабораторий, поддерживающих каждую из линий, приведен в работе [21].

² Линия выведена в лаборатории автора.

мыши, чем любая другая особенность мышинной модели. Анализ создания конгенных по *MHC* и конгенных рекомбинантных линий позволяет оценить как преимущества, так и границы использования таких животных для иммуногенетического анализа.

Конгенные резистентные линии можно получать с помощью различных методов селективных скрещиваний; одна из наиболее удобных схем приведена на рис. 13.6. Начиная работу с двумя инбредными линиями, названными условно А и В, исследователь ставит себе задачу получить такую линию, геном которой был бы идентичен геному линии А по всем локусам, кроме главного локуса гистосовместимости, *H-2*; этот локус должен быть унаследован от линии В. Полученная линия будет названа А.В. В соответствии с приведенной схемой (рис. 13.6) две инбредные линии вначале скрещивают для получения гибридов F_1 . Как отмечалось ранее, можно полагать, что обе линии гомозиготны по всем аутосомным локусам. Поэтому все локусы поколения F_1 должны быть

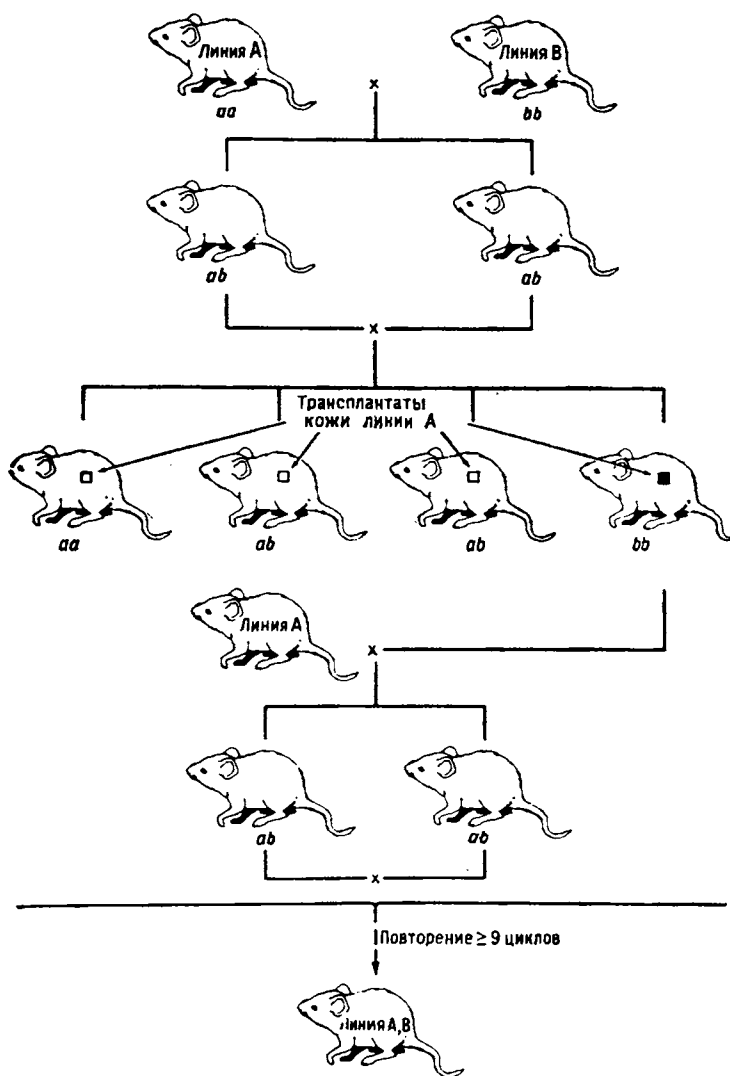


Рис. 13.6. Схема получения конгенной линии (А.В.).

Представлена система интеркроссов — бэккроссов, в которой селекция по генам гистосовместимости производится путем трансплантации кожи потомству каждого интеркросса и последующего отбора животных, отторгающих трансплантат родительской линии А.

гетерозиготными (ab). Животных F_1 скрещивают между собой (интеркросс) и получают поколение F_2 . В этом поколении распределение аллелей по всем аутосомным локусам в идеальном случае соответствует биномиальному распределению. Для любого взятого наугад локуса ожидаемая частота животных генотипа bb составляет $1/4$. Мышам F_2 прививают трансплантат кожи или опухоли линии А. Животные, отторгнувшие трансплантат, хотя бы по одному локусу гистосовместимости должны иметь генотип bb . Очевидно, большинство животных этого поколения отторгнут трансплантат, так как локусов гистосовместимости очень много. Тем не менее, если отобрать только животных, у которых наблюдалось интенсивное отторжение, можно с уверенностью сказать, что тем самым проведена селекция гомозигот bb по локусу $H-2$.

На следующем этапе проводят возвратное скрещивание мышей: мышей, отторгнувших трансплантат от линии А, скрещивают с животными линии А. Полученное потомство вновь будет гетерозиготно по интересующему нас локусу. Для всех остальных локусов (не подвергающихся селекции) вероятность гомозиготности (aa) будет равна вероятности гетерозиготности (ab) и составит 50%. Очевидно, что приблизительно 50% неселектируемой генетической информации в результате возвратного скрещивания ревертирует к инбредной линии А. В потомстве от возвратного скрещивания опять-таки проводят интеркросс, чтобы получить в поколении F_2 ожидаемое распределение локусов, по которым ведется отбор. Животным F_2 прививают ткань линии А и отбирают особей, активно отторгающих трансплантат. Процент особей, активно отторгающих трансплантат, в этом поколении будет меньше, чем в предыдущем. Отбор таких мышей является следующим циклом селекции гомозигот bb по локусу $H-2$. Отобранных животных подвергают возвратному скрещиванию с линией А; в результате снова получают гетерозигот ab по локусу или локусам, по которым проводится селекция. Однако на этот раз вероятность того, что какой-либо не подвергавшийся селекции локус останется в гетерозиготной форме, снижается до 25%.

Этапы межлинейного скрещивания, интеркросса и отбора мышей, отторгающих трансплантаты, последовательно повторяют. После завершения девяти циклов можно ожидать, что среди потомков, полученных в результате интеркросса, расщепление будет идти только по одному локусу гистосовместимости, так что трансплантат будет отторгаться лишь у 25% потомков интеркросса. Учитывая, что в ходе селекции отбирали лишь животных с интенсивной реакцией отторжения, экспериментатор может с большой уверенностью полагать, что селекция проведена именно по локусу $H-2$. Кроме того, вероятность, что какой-либо другой не подвергавшийся селекции локус остался гетерозиготным и не ревертировал в сторону гомозиготного генотипа aa , снижается до $< 0,2\%$. Другими словами, можно ожидать, что более 99,8% локусов, по которым отбор не проводился, идентичны соответствующим локусам линии А. Из последнего интеркросса выбирают гомозиготных самца и самку и из их потомства путем последовательного инбридинга получают конгенную резистентную линию А.В.

Гены млекопитающих передаются, как известно, в виде сцепленных групп в хромосомах. Поэтому в результате такого процесса в генах, тесно сцепленных с локусом, по которому проводится селекция, всегда остается какое-то количество генетической информации bb . Однако, как будет показано далее, происходящие при интеркроссах рекомбинации приводят к фиксации генотипа aa в локусах, расположенных в той же хромосоме, что и MHC (хромосома 17), хотя и на некотором варьирующем расстоянии от локуса $H-2$. Для практических целей животных, прошедших по крайней мере девять циклов такого селективного размножения, принято считать конгенными.

Как видно из табл. 13.6, к настоящему времени создано и поддерживается много конгенных линий $H-2$, полученных на различной генетической основе. В целом названия этих линий соответствуют формуле $A.B$, где линия A дает генетическую основу, а линия B является второй родительской линией, альтернативный аллель $H-2$ которой встраивают в генотип A . Номенклатура аллелей $H-2$ будет подробно представлена дальше.

На данном этапе достаточно понять, что всем первоначально полученным линиям мышей были даны обозначения в виде строчных букв, соответствующих конкретным сочетаниям аллелей их генов MHC . Эти обозначения (строчные буквы) часто называют обозначениями гаплотипа (табл. 13.6). Например, линии $C57BL/10$ присвоено обозначение гаплотипа $H-2^b$, а линии $DBA/2$ — $H-2^d$. Линию $C57BL/10$ сокращенно называют $B10$, а линию $DBA/2$ — $D2$. Таким образом, конгенная линия $B10.D2$ представляет собой КР-линию с базовым генотипом (генетической основой) от линии $C57BL/10$ и MHC от линии $DBA/2$. Эта линия почти по всем параметрам сходна с конгенной для нее линией $C57BL/10$, но отличается от нее по тем свойствам, которые контролируются генами, сцепленными с MHC . Подобным же образом линия $C3H.B10$ была получена скрещиванием линий $C3H$ ($H-2^k$) и $C57BL/10$ ($H-2^b$).

Название КР-линий включает в себя также в скобках после букв дополнительные обозначения — такие, например, как (18M), позволяющие различать разные конгенные линии, полученные от одинаковых скрещиваний. Поскольку было создано много конгенных линий, в базовый генотип которых включились различные локусы гистосовместимости, помимо $H-2$, эти цифры часто используют, чтобы отличать друг от друга разные линии. Однако в большинстве случаев для описания MHC -конгенной линии не обязательно использовать суффикс. Так $B10.D2$ является общепринятым обозначением $H-2$ -конгенной линии, полученной из линий $C57BL/10$ и $DBA/2$.

13.3.2. Рекомбинация в пределах локуса MHC

Как видно из рис. 13.6, получение каждого последующего поколения по приведенной схеме включает в себя скрещивание гетерозигот по локусу $H-2$. При размножении гетерозигот всегда может произойти рекомбинация между аутосомами и в мейозе. В процессе создания конгенной линии такие рекомбинации могут уменьшить количество вносимой с $H-2$ генетической информации, сцепленной с этим локусом. Поэтому, чем больше возвратных скрещиваний (бэккроссов) проведено при получении конгенной линии, тем ближе к локусу $H-2$ будут прилегать границы, за пределами которых хромосома ревертировала в нужном направлении, т. е. в сторону той линии, из которой происходит базовый генотип. Однако MHC сам по себе состоит из множества генов, и поэтому при таких скрещиваниях могут также возникать рекомбинации в пределах локуса $H-2$. Именно благодаря выявлению и характеристике таких рекомбинантов была создана карта сцепления $H-2$. Рассмотрим теперь, каким образом осуществляется выявление таких рекомбинантов и их использование при анализе тонкой генетической структуры локуса $H-2$.

Для выявления рекомбинации необходимо проанализировать потомство интеркросса или бэккросса, учитывая сразу несколько характерных для MHC параметров. Дело в том, что уловить факт рекомбинации можно лишь в том случае, если сочетание каких-либо двух параметров проявляется в потомстве иначе, чем у родителей. Так, в процессе создания КР-линии $A.B$ (обозначения условные) может, например, произойти рекомбинация, показанная на рис. 13.7. Предположим, что потомство анализируют по таким свойствам, как а) энергичное

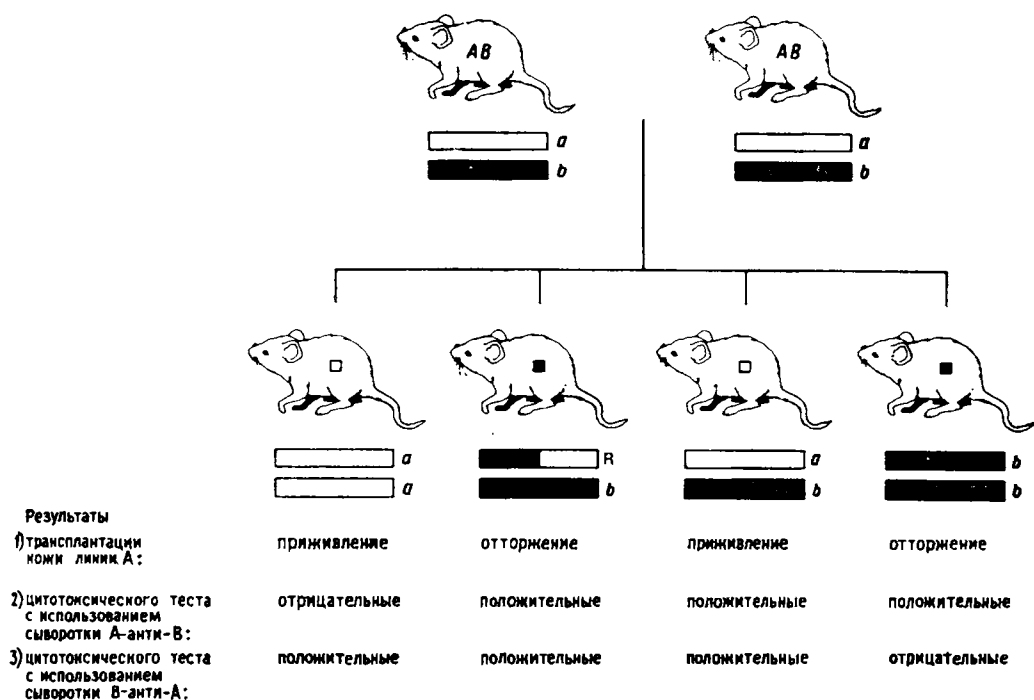


Рис. 13.7. Появление интра-МНС-рекомбинации в процессе создания конгенной линии. Рекомбинация между $H-2^a$ и $H-2^b$ у одного из родителей привела к возникновению нового, рекомбинантного гаплотипа у одного из потомков.

отторжение трансплантата кожи линии А (т. е. генотип bb локуса гистосовместимости) и б) экспрессия на лимфоцитах продуктов генов a или b , выявляемая в комплементзависимом цитотоксическом тесте. При этом для определения продуктов bb используются сыворотки А-анти-В и для определения продуктов aa — сыворотки В-анти-А.

Как показано на рис. 13.7, в результате рекомбинации в пределах локуса $H-2$ может получиться особь, типизируемая как bb по тесту трансплантации кожи (ввиду наличия фрагмента комплекса $H-2$, ответственного за отторжение трансплантата), но в то же время типизируемая серологически как ab (поскольку клетки этой особи реагируют как с сывороткой А-анти-В, так и с сывороткой В-анти-А). Очевидно, такое животное не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к конгенной линии, и его не следует использовать далее при выведении такой линии. Однако именно это животное предположительно является рекомбинантом, и в результате возвратных скрещиваний (бэкросов) с линией А оно может дать начало конгенной рекомбинантной линии, которая будет названа А.В(1R). Линия, полученная с использованием следующего выявленного рекомбинанта, получит название А.В(2R). Таким путем можно вывести серию конгенных линий, каждая из которых будет отличаться от «основной» линии А по локусу МНС. Линии будут также различаться между собой, поскольку рекомбинации в пределах МНС могут происходить в различных точках этого локуса.

К счастью, исследователи, занимавшиеся генетикой мыши, представляли себе возможность таких рекомбинаций и не выбраковывали рекомбинантов,

получавшихся при создании *H-2*-конгенных линий. В результате в настоящее время имеется серия рекомбинантных линий между линиями C57BL/10 (*H-2^b*) и A/WySn (*H-2^a*). Эту серию получил Стимпфлинг (Stimpfling) при создании КР-линии В10.А; анализ рекомбинантов принес большую информацию о тонкой генетической структуре локуса *H-2* [23]. Так, линии В10.А(2R) и В10.А(4R) были использованы для картирования ряда генов иммунного ответа в пределах

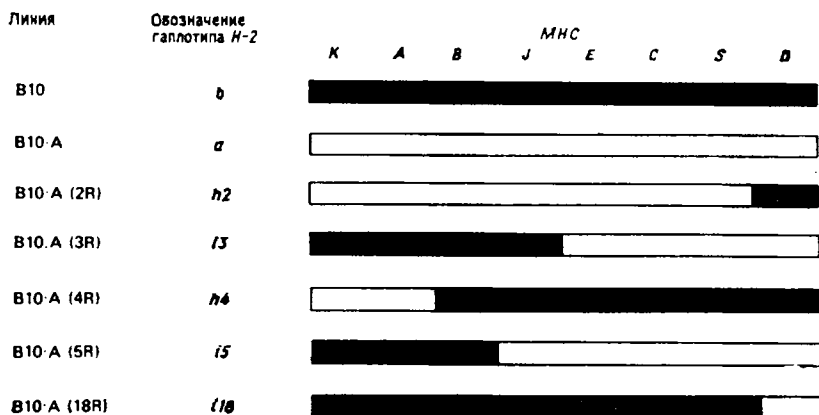


Рис. 13.8. Некоторые рекомбинантные линии В10.А, полученные при выведении конгенной линии В10.А [23].

MHC, а эксперименты с линиями В10.А(3R) и В10.А(5R) позволили выявить область *I-J*. Разнообразие интра-*H-2*-рекомбинантов на примере конгенных рекомбинантных линий В10.А отражено на рис. 13.8. В табл. 13.7 приведены данные о многих широко используемых конгенных рекомбинантных линиях и указаны известные или предполагаемые участки рекомбинации. Чтобы понять терминологию, используемую в этой таблице для обозначения рекомбинантных гаплотипов, необходимо ознакомиться со следующим разделом настоящей главы, где карта локуса *H-2* рассматривается более детально.

Конгенные линии поддерживают, как правило, последовательным инбридингом. Как следует из сказанного в начале настоящей главы, эти линии подвержены такому же генетическому дрейфу, как и любые другие сублинии инбредных мышей. Так, хотя исходно линии В10 и В10.А различались только по локусу *MHC*, в базовом генотипе обеих линий накопилось и фиксировалось множество мутаций, так что эти линии уже отличаются не только по *H-2*, но и по базовому генотипу. Во избежание влияния дрейфа генов из базового генотипа на результаты экспериментов некоторые лаборатории время от времени скрещивают конгенных животных с родительской линией (бэккроссы) и между собой (интеркроссы) и из потомства интеркроссов вновь отбирают особей, гомозиготных по локусу *H-2* для дальнейшего инбридинга. В колонии автора этих строк такие скрещивания проводят через каждые 6—10 поколений. Эта процедура не предотвращает дрейфа от исходного базового генотипа, но позволяет поддерживать в пределах конкретной колонии постоянный набор базовой информации у всех вариантов, конгенных по базовому генотипу.

Таблица 13.7. Конгенные рекомбинантные гаплотипы

Участок рекомбинации	Гаплотипы родителей ¹	Обозначение гаплотипа	KABJECSD	Наличие дополнительного рекомбинантного участка ²	Линии, имеющие рекомбинантный гаплотип
K-A	<i>b/m</i>	<i>bq1</i>	<i>b</i> <i>k k k k k k q</i>	Да	B10.MBR, A.MBR
	<i>d/?</i>	<i>ar1</i>	<i>d</i> <i>f f f f f f q</i>	Да	LG/Ckc, B10.LG
	<i>q/a</i>	<i>y1</i>	<i>q</i> <i>k k k k d d d</i>	Да	B10.AQR
	<i>s/a1</i>	<i>t1</i>	<i>s</i> <i>k k k k k k d</i>	Да	A.TL, B10.TL
A-B	<i>a/b</i>	<i>h4</i>	<i>k k</i> <i>b b b b b b</i>	Нет	B10.A(4R)
	<i>d/b</i>	<i>g2</i>	<i>d d</i> <i>b b b b b b</i>	Нет	D2GD, B10.GD
B-J	<i>b/a</i>	<i>i5</i>	<i>b b b</i> <i>k k d d d</i>	Да	B10.A(5R)
J-E	<i>b/a</i>	<i>i3</i>	<i>b b b</i> <i>b k d d d</i>	Да	B10.A(3R)
	<i>s/t1</i>	<i>t3</i>	<i>s s s</i> <i>s k k k d</i>	Да	B10.HTT
E-C	<i>?k/?d</i>	<i>a</i>	<i>k k k k k</i> <i>d d d</i>	Нет	A, B10.A
C-S	<i>d/k</i>	<i>o1</i>	<i>d d d d d</i> <i>k k</i>	Нет	C3H.OL, B10.OL
	<i>s/d</i>	<i>t5</i>	<i>s s s s s</i> <i>s d d</i>	Нет	BSVS, B10.BSVS
S-D	<i>b/a</i>	<i>i</i>	<i>b b b b b b b</i> <i>d</i>	Нет	HTI, B10.HTI
	<i>b/a</i>	<i>i18</i>	<i>b b b b b b b</i> <i>d</i>	Нет	B10.A(18R)
	<i>b/y1</i>		<i>b b b b b b b</i> <i>d</i>	Нет	B10.YBR
	<i>b/k</i>		<i>b b b b b b b</i> <i>k</i>	Нет	C3H.KBR
	<i>d/b</i>	<i>q</i>	<i>d d d d d d d</i> <i>b</i>	Нет	HTG, B10.HTG
	<i>d/k</i>	<i>o2</i>	<i>d d d d d d d</i> <i>k</i>	Нет	C3H.ON, B10.ON
	<i>f/t2</i>	<i>ap2</i>	<i>f f f f f f f</i> <i>d</i>	Нет	A.TFR2
	<i>a/b</i>	<i>h</i>	<i>k k k k k d d</i> <i>b</i>	Да	HTH
	<i>a/b</i>	<i>h1, h2</i>	<i>k k k k k d d</i> <i>b</i>	Да	B10.A(1R), B10.A(2R)
	<i>k/?q?</i>	<i>m</i>	<i>k k k k k k k</i> <i>q</i>	Нет	AKR.M, B10.AKM
	<i>q/a</i>	<i>y2</i>	<i>q q q q q q q</i> <i>d</i>	Нет	B10.T(6R)
	<i>t1/b</i>	<i>at1</i>	<i>s k k k k k k</i> <i>b</i>	Да	A.TBR1
	<i>s/a</i>	<i>t2</i>	<i>s s s s s s s</i> <i>d</i>	Нет	A.TH, B10.S(7R)
	<i>t1/f</i>	<i>an1</i>	<i>s k k k k k k</i> <i>f</i>	Да	A.TFR1
	<i>s/bq1</i>	<i>sq3</i>	<i>s s s s s s s</i> <i>q</i>	Нет	B10.SQR

¹ Знаком вопроса отмечены предполагаемые гаплотипы.

² Отметим, что многие рекомбинанты включают в себя по крайней мере один гаплотип, уже содержащий известную или предполагаемую рекомбинацию. Такие гаплотипы отмечены словом «Да», и в таблице приведен только рекомбинантный интервал, соответствующий наиболее поздней рекомбинации в истории гаплотипа.

13.4 Комплекс H-2

13.4.1. Генетическая карта комплекса H-2

Как говорилось в предыдущем разделе, возникновение многочисленных рекомбинаций (происшедших в результате специальных скрещиваний и случайно) при создании конгенных линий позволило определить линейную последовательность генов, ответственных за целый ряд свойств, связанных с *MHC* мыши. Кроме того, надо отметить, что использование конгенных рекомбинантных линий (в которых рекомбинантные варианты сохраняются в гомозиготной форме) позволяет быстро находить соответствие между вновь открываемыми свойствами *MHC* и определенными участками на линейном генетическом векторе. Линейную последовательность таких участков часто называют картой *H-2*. Современные представления о карте *H-2* и связи этого локуса с другими маркерными локусами хромосомы 17 отражены в виде диаграммы на рис. 13.9.

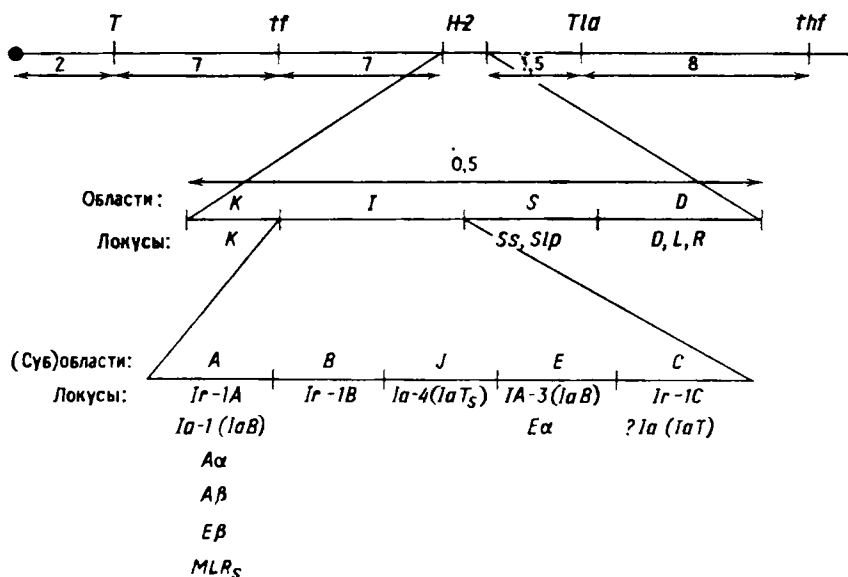


Рис. 13.9. Линейная карта комплекса $H-2$ (хромосома 17).

Настоящий раздел посвящен детальному описанию разнообразных компонентов этой карты. Вначале, однако, следует ознакомиться с номенклатурой, общепринятой для описания компонентов MHC мыши.

13.4.1.1. Терминология

Как отмечалось в начале этой главы, генетическая номенклатура, используемая для описания компонентов MHC , довольно запутана. Усложненность — неотъемлемая особенность любой системы обозначений полиморфных вариантов многочисленных тесно сцепленных локусов, особенно если эта система должна также учитывать множество серологических перекрестных реакций между продуктами этих локусов. Тем не менее много путаницы в номенклатуре $H-2$ возникло исторически. Например, использование одинаковых букв для обозначения локусов и аллелей этих локусов (K^k) и, несомненно, неувязки номенклатуры будут устранены впоследствии при создании более приемлемого варианта. Пока этого не произошло, необходимо ознакомиться с номенклатурой, используемой в настоящее время.

13.4.1.2. Области

Участок хромосомы, который можно определить по рекомбинациям, демаркирующим с обеих сторон его границы, называется *областью*. Понятно, что это определение сугубо описательное и несет мало информации о природе генов, заключенных в границы области. Для описания новой области необходимо иметь сведения о новом рекомбинанте, у которого произошло расщепление ранее известной области, соответствующее линейной генетической карте. Так, в течение многих лет на основании всех имевшихся данных о MHC рекомбинанты $B10.A(3R)$ и $B10.A(5R)$ считались генетически идентичными. Оказалось, однако, что антитела, полученные в результате реципрокных иммуниза-

ций между этими линиями, реагируют с супрессорными Т-клетками [24]. Поэтому было постулировано, что эти линии имеют разные сайты рекомбинации, и участок хромосомы, по которому они различаются, получил название *I-J* (рис. 13.8).

Четыре основные области комплекса *H-2* (рис. 13.9), обозначаемые *K*, *I*, *S* и *D*, расположены в линейной последовательности по отношению к центру хромосомы 17. Раньше предполагали, что рекомбинации в пределах области *I* разделяют гены сходной природы, поэтому области, определяемые такими рекомбинациями, иногда называли «субобластью» или участком. Сегодня эта точка зрения представляется ошибочной, и, видимо, правильнее будет говорить, что к настоящему времени в комплексе *H-2* определено восемь областей *K*, *A*, *B*, *J*, *E*, *C*, *S*, *D*, для каждой из которых имеется хотя бы один вариант рекомбинации, отделяющий его левую и правую границы от прилежащих областей. Тем не менее в литературе еще часто можно встретить термины *I-A*, *I-B* и т. д., обозначающие области *A*, *B*, *J*, *E* и *C* как участки области *I*.

13.4.1.3. Аллели

Специфика методов, используемых для изучения свойств *MHC* и определения его областей, требует, чтобы гены этих областей присутствовали в исследуемой популяции в альтернативных формах. Классическая генетика называет такие альтернативные формы генов аллелями. Исследователи генетики *MHC* вначале не представляли себе, сколько генов включает в себя этот комплекс; надо отметить, что точного ответа на этот вопрос нет до сих пор. Поэтому аллели генов *MHC* вначале ассоциировали с первыми инбредными линиями и обозначали строчными буквами. Например, линии *A* было дано аллельное обозначение *H-2^a*, линии *C57BL* — обозначение *H-2^b* и т. д. В табл. 13.8 приводится список нерекомбинантных гаплотипов *H-2* (см. далее) и соответствующих линий мышей. Для таких линий используют одно и то же обозначение аллели при описании как всего *MHC* в целом, так и каждой области или каждого гена.

Таблица 13.8. Гаплотипы *H-2* независимого происхождения и несущие их линии [21]

Гаплотип	Линии
<i>b</i>	A.BY, AKR.B6, BALB.B10, C3H.B10/Sf, C3H.SW, C57BL/6, C57BL/10Sn, C57L, D1.LP, D2.B6, ST/a, 129, LP/J
<i>d</i>	BALB/cBy, BALB/cJ, B6.C-H-2 ^d , B10.D2, C3H.D, C57BL/Ks, DBA/2J, D1.C, LG/J, NZB, YBL/Rr, YBR/Wi
<i>f</i>	A.CA, B10.M, RFM/Un
<i>j</i>	BALB.1, C3H.JK, I/St
<i>k</i>	AKR, BALB.AKR, BALB.K, BRVR, B6.C3H, B10.BR, B10.CBA, B10.K/Sf, CBA/CaJ, CE, C3H/An, C3H/Bi, C3H/DiSn, C3H/He, C3H/St, C3H.T, C3H.A, C57BL/6-H-2 ^k , C57BR/a, C57BR/cd, C58, D1.ST, MA/J, ST/bJ, 101
<i>p</i>	BDP/J, B10.CNB, B10.NB, B10.P, C3H.NB, P/Sn
<i>q</i>	B10.D1/Ph, B10.G, B10.Q, C.St, CBA/Rij, C3H/HeNRe, C3H.Q, DBA/1, STOL1, SWR/J, TF
<i>r</i>	B10.RIII(71NS), CR/Sf, C3H.RIII, LP.RIII, RIII/J, RIII/Wy
<i>s</i>	A.SW, B10.ASW, B10.S, TN
<i>u</i>	B10.PL, PL/J
<i>v</i>	B10.SM, SM/J
<i>z</i>	NZW

В случае рекомбинантных гаплотипов принято отдельно обозначать аллели областей комплекса $H-2$ или генов, входящих в эти области, в соответствии с происхождением (известным или предположительным) этих областей от одной из исходных (родительских) инбредных линий (пример обозначения аллельных вариантов областей приведен в табл. 13.7).

13.4.1.4. Гаплотип

Совокупность всех аллелей индивидуальных сцепленных областей, наследуемых в одной хромосоме, называется *гаплотипом*. Например, гаплотип $H-2$ одной из первых инбредных линий, линии C57BL/6 ($H-2^b$), по определению содержит аллель b во всех областях $H-2$ ($K^bA^bB^bJ^bE^bC^bS^bD^b$). С другой стороны, рекомбинантные гаплотипы $H-2$ включают в себя сочетания областей, имеющих неодинаковые аллельные обозначения в связи с их происхождением (известного или предположительного) от разных исходных линий. Например, линии A.TL ($K^sA^hB^hJ^hE^hC^hS^hD^d$) получила область K от гаплотипа $H-2^s$, область D — от $H-2^d$, а промежуточные области — от $H-2^h$. В процессе создания этой линии произошли две независимые рекомбинации. Поскольку полученный гаплотип в целом тоже обозначают строчной буквой, возникает некоторая путаница. Если данный гаплотип имеет независимое происхождение и не включает в себя рекомбинации каких-либо двух других гаплотипов, то как весь гаплотип, так и аллели его областей обозначают одной и той же буквой (как в случае гаплотипа $H-2^b$). Однако, если сочетание аллелей в отдельных областях включает в себя известную или предполагаемую рекомбинацию между различными гаплотипами, такая новая комбинация (т. е. гаплотип) получает новое обозначение. Вначале для обозначения гаплотипов использовали строчные буквы (например, гаплотипы $H-2^a$, $H-2^g$, $H-2^h$; см. табл. 13.6—13.8). Поскольку букв алфавита оказалось недостаточно для описания всех возможных рекомбинантных гаплотипов, некоторые недавно полученные рекомбинантные варианты получили составные названия, такие, как $H-2^{ap2}$ и $H-2^{bq1}$. По общей договоренности буква (или составное название) гаплотипа выбирается только в соответствии с аллелями областей K и D . Новым рекомбинантным гаплотипам, имеющим такие же аллели в областях K и D , в соответствии с хронологической последовательностью их появления присваивают порядковые номера, которые пишут после сочетания букв. Так, гаплотипы линий A.TL и A.TH, идентичных по своим областям K и D и различающихся по центральным областям, обозначаются соответственно $H-2^{t1}$ и $H-2^{t2}$. Хотя написание гаплотипа линии A в форме $K^aA^aB^aI^aE^aC^aS^aD^a$ не будет нарушением правил, написание его в виде $K^hA^hB^hI^hE^hC^dS^dD^d$ дает больше информации о происхождении этого гаплотипа и его связи с гаплотипами $H-2^h$ и $H-2^d$.

13.4.1.5. Лocus

Термин *локус* является, по-видимому, наименее определенным и вольно используемым понятием в номенклатуре гаплотипа $H-2$; тем не менее он один из самых общеупотребительных. В строгом смысле генетический локус — это один ген, ответственный за синтез одного белка и отделяемый рекомбинацией от соседних генов. На практике, однако, термин используется для обозначения самых различных объектов, начиная с единичных участков картирования

в пределах известной области вплоть до комплекса *H-2* в целом. Локусам присваивали названия на основании функциональных свойств, идентификации конкретных химических продуктов или серологического картирования предполагаемых продуктов.

Как показано на рис. 13.9, в пределах области *A* было охарактеризовано много локусов. Это локус *Ir* разнообразных функционально определяемых генов *Ir*, локус *Ia-1* множества выявляемых на поверхности клеток серологических специфичностей *Ia*, а также локусы, определяемые по биохимически идентифицированным молекулам клеточной поверхности. Остается неясным, являются ли все эти свойства функциями одних и тех же продуктов, кодированных в генах области *A*. Если это так, то наличия в области *A* трех генов было бы вполне достаточно, чтобы объяснить свойства всех известных в этой области локусов. С другой стороны, если эти свойства не являются функцией продуктов одних и тех же генов, в пределах этой области следовало бы искать многочисленные «истинные» локусы. Как показано далее в настоящей книге (гл. 16), есть основания думать, что функция генов *Ir* реализуется антигенами *Ia*, однако до сих пор не удалось убедительно доказать, что в этой области не содержатся другие гены.

Принято считать, что в каждой области имеется по меньшей мере один локус, хотя теоретически возможна рекомбинация внутри гена, создающая функциональные изменения, которые могут быть интерпретированы как результат деятельности разных (раздельных) генов. Наоборот, очевидно, что любая область, выявленная по рекомбинациям, может содержать много генетических локусов. Таким образом, как только возникают серьезные основания для выделения нового локуса в пределах данной области, такой локус получает свое название. В качестве примера можно назвать локус *L*, недавно определенный в пределах области *D* [25]. Как будет видно из последующего изложения, этот локус был определен при изучении мутантной линии, у которой, вероятно, в результате делеции не экспрессируется молекула *L*, несмотря на нормальную экспрессию молекулы *D*. Хотя до сих пор ген, кодирующий молекулу *L*, не удалось отделить рекомбинацией от соседних генов, результаты биохимических исследований позволяют предполагать, что молекула *L* является продуктом отдельного гена. Поэтому в пределах области *D* был определен второй структурный локус, локус *L*. С другой стороны, определение локуса на основании такой функции гена *Ir*, как *Ig*-наза, в области *B*, отражает лишь тот факт, что эту функциональную особенность, а именно способность реагировать на нуклеазу как на антиген, можно генетически картировать в этой области. Такая информация ничего не говорит ни о природе соответствующего гена, ни о структуре продукта, ответственного за эту функцию.

13.4.1.6. Специфичности

Выявляемые серологически индивидуальные детерминанты, по которым различаются аллельные формы продуктов генов *H-2*, называют специфичностями. Специфичностям присваивают номера, соответствующие хронологической последовательности их выявления. Нумерация специфичностей молекул, закодированных в областях *K* и *D* (класс I), проводили отдельно от нумерации специфичностей молекул, закодированных в областях *I-A* и *I-E* (класс II); мы остановимся на этом вопросе в последующих частях настоящего раздела.

Теоретически число специфичностей, определяемых иммунологическими методами, зависит от числа имеющихся в распоряжении исследователя гаплотипов. Так, независимо от того, будем ли мы использовать серологические тесты

или реакции клеточного иммунитета, при наличии только двух линий, А и В, невозможно определить более двух специфичностей (А-анти-В и В-анти-А). С другой стороны, если есть линия с третьим, независимым гаплотипом, с ее помощью можно расчленить каждую из этих специфичностей на две: частную специфичность (реакция только с линией, использованной для иммунизации — специфичности 1 и 2; табл. 13.9) и общую специфичность (реакция как с иммунизирующей линией, так и с третьей линией С — специфичности 4 и 5). Кроме того, как отмечено в табл. 13.9, использование третьей линии позволяет выявить

Таблица 13.9. Воображаемый пример распределения специфичностей в трех линиях

Линии	Специфичности					
	1	2	3	4	5	6
А	1				5	6
В		2		4		6
С			3	4	5	

еще две специфичности, одну — частную для линии С (специфичность 3) и одну общую для линий А и В, но отсутствующую у линии С (специфичность 6). Таким образом, имея три линии, можно определить максимум шесть серологических специфичностей. При увеличении числа линий теоретически возможное максимальное число выявляемых специфичностей увеличивается экспоненциально. Формула для определения этого числа, предложенная Горером и Микулска [26], выглядит как $2^n - 2$, где n — число независимых тестируемых линий.

Ввиду разнообразия существующих в настоящее время инбредных линий очевидно, что теоретическое количество доступных для выявления специфичностей очень велико. Не все теоретически возможные специфичности выявлены и пронумерованы, хотя следует отметить, что число известных специфичностей антигенов класса I и класса II МНС мыши непрерывно возрастает. Большинство специфичностей являются общими, т. е. связаны с более чем одним аллелем *H-2*. Однако для каждого гаплотипа характерен также набор частных специфичностей, экспрессированных лишь одним аллелем каждого из локусов. Понятие частной специфичности — это рабочее определение, так как любую специфичность, рассматриваемую как частную, потенциально можно разделить на общую и частную, если использовать новый аллель, найденный, например, в гаплотипе диких мышей. В целом каждый гаплотип можно характеризовать по крайней мере одной частной специфичностью в каждом из экспрессированных локусов МНС. Так, если рассматривать продукты локусов класса I, гаплотип *H-2^b* характеризуется частными специфичностями *H-2.33* и *H-2.2* локусов *H-2K* и *H-2D* соответственно. Подобным же образом каждый гаплотип можно было бы характеризовать частными специфичностями *Ia* продуктов областей *I-A* и *I-E*, хотя, как будет показано далее, не все гаплотипы экспрессируют продукты области *E*.

Общие специфичности представляют собой гораздо более сложную проблему, поскольку их распределение чрезвычайно индивидуально и не укладывается в одну схему. Существуют общие специфичности различных аллелей конкретного локуса, одинаковых или различных аллелей разных локусов.

Например, специфичность H-2.5 определяется как специфичность аллелей K^k , K^b и D^k . Хотя в свое время полагали, что такая сложная система реакций связана с наличием в большинстве аллоиммунных сывороток комплекса антител разной специфичности, сегодня очевидно, что моноклональные антитела против H-2 также выявляют многочисленные общие специфичности H-2 [27, 28]. Из этого можно предположить, что общие специфичности представляют сходные структурные детерминанты разных молекул H-2. Существование общих детерминант у продуктов локусов K и D отражает происхождение этих локусов от общего гена предшественника [29].

При использовании таблиц серологических специфичностей очень важно представлять себе, что даже если общая для двух гаплотипов специфичность еще не определена и не названа, это еще не означает, что ее не существует. Действительно, исходя из опыта автора данной главы, как правило, можно найти общие специфичности для любых двух аллелей класса I, если использовать соответствующую схему иммунизации и абсорбции. Кроме того, большинство новых моноклональных антител против МНС выявляют новые общие специфичности, т. е. специфичности локуса H-2, распределенные между разными линиями иначе, чем какие-либо ранее известные специфичности.

13.4.1.7. Несколько слов об истории терминологии

Излагаемые здесь сведения предназначены для читателя, которому интересно узнать, как номенклатура локуса H-2 достигла современного уровня сложности. Мы не собираемся подробно освещать историю развития генетики H-2, но кратко и схематично изложим последовательность событий, обусловивших появление принятой сегодня терминологии (более детально этот вопрос освещен в работе Снелла и Стимпфлинга [14]).

Как мы уже говорили, вначале аллели (варианты) H-2 инбредных линий обозначали строчными буквами. Так, линии A было присвоено обозначение H-2^a, линии B6 — H-2^b и т. д. Первые выявленные серологические специфичности обозначали заглавными буквами. Часто буквы подбирали так, чтобы они совпадали с обозначением аллели линии, в которой находили соответствующую специфичность. Поэтому специфичность, обнаруженную в H-2^d, называли D, специфичность, обнаруженную в H-2^k — K и т. д. Общие специфичности обозначали другими заглавными буквами в соответствии с хронологической последовательностью определения этих специфичностей. Поскольку серологам вскоре стало ясно, что для обозначения всех специфичностей не хватит букв алфавита, буквы заменили цифрами. В табл. 13.10 приведена упрощенная схема серологических специфичностей H-2 в том виде, какой она имела в 60-х годах. Как видно из таблицы, специфичность H-2.1 (новая терминология) соответствует специфичности A по старой терминологии, специфичность H-2.2 — специфичности B и т. д.

Впервые событие рекомбинации в пределах локуса H-2 было постулировано на основании трансплантационных тестов, когда оказалось, что гибриды F_1 с генотипом H-2^d × H-2^k не отторгают перевиваемые опухоли линии A (генотип H-2^a). Появилось предположение, что гаплотип H-2^a возник в результате рекомбинации между H-2^d и H-2^k. Серологические исследования подтверждали это предположение, поскольку клетки линии A реагировали как с сыворотками, выявлявшими H-2.4 (специфичность D гаплотипа H-2^d), так и с сыворотками против H-2.11 (специфичность «K» гаплотипа H-2^k). Поэтому был сделан вывод, что эти специфичности расположены в линейном порядке D, K, где под D и K подразумевались специфичности, называемые сейчас H-2.4 и H-2.11.

Таблица 13.10. Старая карта специфичностей H-2
(по Свеллу и Стимпфлингу [14]).

Аллели H-2	Аллоантигенные специфичности												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	M	N
<i>a</i>	1		3	4	5	6		8		10	11	13	14
<i>b</i>		2			5	6							14
<i>d</i>			3	4		6		8		10		13	14
<i>f</i>						6	7	8	9				
<i>g</i>		2				6		8					
<i>h</i>	1	2	3		5	6		8			11		14
<i>i</i>			3	4	5	6						13	
<i>k</i>	1		3		5			8			11		
<i>m</i>	1		3		5			8			11	13	

Таким образом, две области, определенные раньше других на карте H-2, получили названия *D* и *K*. Последующий анализ рекомбинаций, разделявших серологические специфичности, показал, что в пределах локуса H-2 существует много областей, и к концу 60-х годов карта H-2 имела следующий вид: *D*, *C*, *B*, *E*, *A*, *K*, причем каждая из букв соответствовала серологическим специфичностям, картированным при анализе рекомбинантов. В это время Кляйн [30] предложил изменить в обратном порядке последовательность написания этих локусов, так как, по данным цитогенетики, область *K* располагается в хромосоме 17 ближе к центромере, чем область *D*. Появились также данные об области *I*, связанной с генами *Ir*, и области *S*, кодирующей сывороточный белок (см. далее). Эти области были картированы в пределах комплекса H-2, и их линейное расположение выглядело так: *K*, *A*, *I*, *S*, *E*, *B*, *C*, *D*.

В начале 70-х годов была выдвинута гипотеза, согласно которой области *A*, *E*, *B* и *C*, выявленные при анализе рекомбинаций между серологическими специфичностями, на самом деле являются не областями, а общими специфичностями, присущими как продуктам области *K*, так и продуктам области *D*. Так возникла схема для описания антигенов класса I MHC, включающая в себя два локуса класса I, разделенные областями *I* и *S* [31]. Эта схема, *KISD* принята и в настоящее время.

13.4.2. Локусы класса I

Ранее в этой главе мы уже отмечали главные особенности, позволяющие считать конкретную молекулу клеточной поверхности продуктом локуса класса I. Эти особенности включают в себя серологические и иммунохимические свойства, распределение в тканях и связь с определенными функциями. В определение локусов класса I можно включить такой критерий, как происхождение от общего гена-предшественника класса I (например, гомологичность аминокислотных последовательностей или последовательностей оснований ДНК). Последнего критерия, хотя он и необходим, недостаточно для того, чтобы отнести локус к классу I, потому что гены, происходящие от тех же генов-предшественников, как и гены областей *K* и *D*, могут не экспрессироваться, а в случае экспрессии продукты этих генов могут резко отличаться по свойствам от продуктов класса I (например, локусы *Qa-2* и *Tla*). Настоящий раздел посвящен детальному изложению свойств продуктов локусов класса I комплекса H-2.

13.4.2.1. Компоненты

Многочисленные критерии говорят о том, что области *K* и *D* содержат локусы класса I. До сих пор существуют убедительные химические данные о наличии лишь одного локуса в области *K*, хотя недавние сообщения позволяют предположить, что в этой области закодировано более одного серологически выявляемого продукта. В то же время область *D* (по крайней мере в некоторых гаплотипах) несомненно содержит несколько локусов класса I. К настоящему моменту в области *D* гаплотипов *H-2^d* и *H-2^q* обнаружено по крайней мере три локуса класса I: *D*, *L* и *R*. Секвенирование молекул *D^d* и *L^d* подтвердило их гомологичность другим молекулам, закодированным в областях *K* и *D*; продукт локуса *R* пока идентифицирован только иммунохимическим путем [32].

Выполненные недавно работы по гибридизации ДНК свидетельствуют о том, что в геноме мыши имеется по крайней мере 15 генов, гомологичных генам антигенов класса I [33]; несомненно, скоро будет выяснена локализация этих генов в хромосоме 17 (см. далее в этой главе и следующую главу). Тот факт, что удастся определить лишь ограниченное число продуктов, можно объяснить рядом причин. Возможно, многие из этих генов не экспрессированы на уровне, доступном для определения, или в пределах одного гаплотипа гены так похожи, что их продукты не удастся отличить. Может быть также, что разные гаплотипы содержат различные количества генов класса I в пределах областей *K* и *D*.

13.4.2.2. Химическое строение

Продукты локусов класса I представляют собой гликопротеины с мол. массой около 45 000. Они нековалентно связаны с легкой гликопротеиновой цепью, с мол. массой ~ 12 000 (бета-2-микроглобулин); эта цепь кодируется в другом участке генома [97].

Тяжелые цепи этих молекул — трансмембранные белки; 80 % такой белковой молекулы расположено на наружной поверхности клеточной мембраны. Остальная часть молекулы состоит из равных по размеру внутримембранного и внутриклеточного участков. Бета-2-микроглобулин нековалентно связан с наружным (внеклеточным) участком тяжелой цепи.

Результаты секвенирования (гл. 14) показывают, что тяжелые цепи класса I относятся к ряду наиболее полиморфных молекул, кодируемых в геноме мыши. Полиморфизм проявляется в определенных участках молекулы; эти участки крайне вариабельны при сравнении разных аллелей; другие районы сравнительно консервативны. По-видимому, полиморфные участки молекулы определяют разнообразие антигенных специфичностей аллелей *H-2*, в то время как более константные области участвуют в поддержании структурной целостности молекулы и в ее взаимодействиях с другими компонентами мембраны. Сочетание высокой степени гомологии константных участков молекул класса I с крайним полиморфизмом вариабельных участков дает возможность относить конкретный продукт к области *K* или *D* только на основании секвенирования. Гомология между всеми молекулами класса I составляет 80—90 %. Гомология между молекулами класса I животных разных видов также чрезвычайно высокая, порядка 70—80 %. Все эти данные подтверждают гипотезу о том, что локусы класса I произошли от общего гена-предшественника.

В отличие от тяжелых цепей бета-2-микроглобулин мыши сравнительно инвариантен в пределах вида. Недавно были найдены слабые аллельные различия, но они отражают лишь минимальный дрейф — может быть, различия меж-

ду аллельными линиями по одной аминокислоте [34]. Последовательности бета-2-микроглобулинов животных разных видов значительно отличаются друг от друга — в не меньшей степени, чем разные аллели тяжелой цепи. Причины консервации последовательности легкой цепи в пределах вида в сочетании с разнообразием тяжелых цепей остаются неясными; видимо, они являются отражением сил, влиявших на процесс эволюции молекул класса I.

13.4.2.3. Распределение по тканям

Локусы класса I экспрессируются, по-видимому, во всех клетках организма, но уровень экспрессии в разных тканях значительно варьирует. Максимальная экспрессия антигенов областей K и D наблюдается на лимфоцитах, при этом количество молекул K, D или L на одну клетку достигает порядка 10^4 — 10^5 . Самая слабая экспрессия этих антигенов характерна для эритроцитов и первичных половых (гаметных) клеток; некоторые специфичности удается обнаружить лишь очень чувствительными методами; другие, по-видимому, вообще не экспрессированы на этих клетках.

13.4.2.4. Серология

Ранее мы уже отмечали сложность серологии антигенов класса I. В табл. 13.11 вкратце суммированы современные представления о серологических специфичностях, характерных для распространенных гаплотипов инбредных линий мышей. Как видно из таблицы, большинство гаплотипов можно охарактеризовать по крайней мере одной частной специфичностью продуктов локусов K и D и многочисленными общими специфичностями, связанными с продуктами локусов K, D, L или их сочетанием. До сих пор не найдено частных специфичностей для продуктов локусов L и R; возможно, эти молекулы также имеют уникальные детерминанты, которые еще не удалось обнаружить с помощью антител. Некоторые из отмеченных в таблице специфичностей определялись как с

Таблица 13.11. Серологические специфичности антигенов H-2 (по Кляйну [20] и Лемке и Хэммерлингу [35]).

Гаплотип H-2(1)	Специфичности					
	K		D		L	
	частные	общие	частные	общие	частные	общие
b	33, m33	5, m5, m6, m10, 27, 28, 29	2, m2	6, m7, m8, m10, 27, 28, 29, 64		
d	31	3, 8, 27, 28, 29	4	3, 6, 13, 27, 28, 29		64, 65
f	26	7, 8, 27	9	6, 9, 27		
k	23, m23	1, m1, 3, m3, 5, m5, m6, 8, m10, 11, m11, 25, m25	32	1, 3, m4, 5, m5, m9, m10		
p	16	1, 5, m5, 7, 8	22	1, 3, 5, m5, 6		
q	17, m17	1, 3, 5, m5, 11, m11	30	3, 6, m8, m10, 13, 27, 28, 29		64, 65
r	18, m18	1, 3, 5, m5, 8, 11, m11, 25, m25	10	1, 5, m5, 6		
s	19	1, 5, m5, 7, m9	12	3, 6, 28		

1) Представлены лишь гаплотипы независимого происхождения; специфичности рекомбинантных гаплотипов можно определить, сопоставив данные, приведенные в этой таблице и в табл. 13.7.

помощью обычных аллоиммунных сывороток, так и с помощью моноклональных антител. Существуют специфичности, определяемые исключительно моноклональными антителами. Очевидно, число специфичностей будет возрастать вместе с получением новых моноклональных антител. Недавно было предложено обозначать специфичности, выявляемые моноклональными антителами, строчной буквой *m*, написанной перед цифровым обозначением [20]. Так, специфичность Н-2.2 определяется как аллоиммунными сыворотками, так и серией моноклональных антител. Если нужно подчеркнуть, что конкретная специфичность выявляется моноклональными антителами, ее можно обозначить Н-2.m2. Распределение общих специфичностей гораздо легче стандартизировать с помощью моноклональных антител, чем с помощью аллоиммунных сывороток, поэтому можно полагать, что в будущем большинство общих специфичностей Н-2 будут определять не с помощью сывороток, а моноклональными реагентами.

13.4.2.5. Функциональные свойства

К функциональным свойствам, безусловно связанным с локусами класса I мыши, относятся сильная реакция отторжения трансплантата, энергичная стимуляция образования антител (именно благодаря этому свойству оказалось возможным изучение серологии соответствующих антигенов), клеточные реакции лимфолиза, а также МНС-рестрикция эффекторных Т-клеток, реагирующих против разнообразных эндогенных и экзогенных антигенов, представленных на клеточной поверхности. Анализ последней функции способствует пониманию физиологического смысла этого класса антигенов (более подробно рестрикция иммунного ответа рассматривается в гл. 4, 11 и 15). Участие антигенов класса I в аллогенных реакциях, несомненно, обусловлено нормальной физиологической ролью этих молекул в иммунном ответе.

13.4.2.6. Молекулярная биология

В течение последних нескольких лет при изучении генов класса I все шире используются рекомбинантные ДНК. Применение зондов кДНК, полученных на информационных РНК человека, дало возможность определять количество генов мышинного генома, имеющих достаточную степень гомологии для перекрестной гибридизации с зондами класса I. Исследования привели к удивительному результату: методом перекрестной гибридизации в геноме мыши было обнаружено более 15 различных генов, гомологичных генам класса I; все эти гены сгруппированы в кластеры в хромосоме 17 [33]. Таким образом, несмотря на то, что обнаружено лишь ограниченное число продуктов класса I, геном мыши содержит, по-видимому, целое семейство соответствующих генов или близкородственных им. Объяснить это можно, вероятно, тем, что либо большая часть этих генов вообще не экспрессируется, либо их экспрессия регулируется таким путем, что образующиеся продукты не удается выявить.

Недавно удалось выделить и клонировать некоторые гены класса I. Эти гены были введены в клетки различного генотипа с помощью процесса, называемого трансфекцией, в результате в трансфицированных клетках наблюдалась экспрессия антигенов класса I, соответствующих источнику трансфицирующей ДНК [36—38]. Очевидно, эти революционно новые подходы принесут много важной информации об организации и эволюции генов класса I мыши. Текущие исследования в этой области освещаются в гл. 14.

13.4.2.7. Мутанты класса I

Мутации играют важную роль в создании генетического разнообразия, и утверждение, что все современные гены класса I возникли из общего гена-предшественника, эквивалентно утверждению, что геном мыши претерпел большое количество мутаций, многие из которых закрепились (фиксировались) в нем. Кроме того, выраженный полиморфизм индивидуальных локусов класса I позволяет сделать вывод, что многие из мутаций не оказывают вредного воздействия на жизнеспособность и воспроизведение потомства. Учитывая это, ряд исследователей предприняли активный поиск новых мутаций в пределах локуса *H-2*. Наиболее распространенным методом выявления таких мутаций был реципрокный анализ гибридов F_1 , служивших одновременно донорами и реципиентами трансплантатов кожи. В зависимости от характера мутации изменение аминокислотной последовательности может проявиться в виде потери антигенной детерминанты, появления новой детерминанты или сочетания этих двух событий. В таких опытах обычно используют гибриды F_1 , поскольку на них можно определить как потерю, так и приобретение антигенной детерминанты, тогда как на гомозиготах можно выявить лишь мутацию, вызывающую появление нового антигена (поскольку ген на второй из парных хромосом, вероятнее всего, останется интактным). Селективный отбор мутантов по антигенам *H-2* проводился на гибридах F_1 двух конгенных линий, различающихся только по локусу *H-2*. В этом случае спектр анализируемых генов ограничивался локусами *H-2*. В табл. 13.12 приведены сведения о гаплотипах, имеющих мутации в молекулах класса I.

К настоящему времени проведен анализ аминокислотной последовательности некоторых мутантов, что дало возможность определить характер мутации и ее локализацию. Как видно из табл. 13.12, мутантные изменения после-

Таблица 13.12. Мутанты класса I (по [40])

Гаплотип	Другие обозначения	Линия	Происхождение	Мутант- ный локус	Положение аминокислот- ных замен [39]
<i>bm1</i>	<i>H21</i> , <i>H-2ba</i>	B6.C-H-2bm1	B6 × BALB/c	K	155, 156
<i>bm2</i>	<i>H249</i> , <i>H-2bb</i>	B6.C-H-2bm2	B6 × BALB/c	K	
<i>bm3</i>	<i>M505</i> , <i>H-2bd</i>	B6-H-2bm3	B6	K	77, 89
<i>bm4</i>	<i>H2170</i> , <i>H-2bf</i>	B6.C-H-2bm4	B6 × BALB/c	K	
<i>bm5</i>	<i>H-2bg1</i>	B6-H-2bm5	B6	K	116
<i>bm6</i>	<i>H-2bg2</i>	B6-H-2bm6	B6	K	116, 121
<i>bm7</i>	<i>H-2bg3</i>	B6.C-H-2bm7	B6 × BALB/c	K	116, 121
<i>bm8</i>	<i>H-2bh</i>	B6-H-2bm8	B6	K	23
<i>bm9</i>	<i>H-2bi</i>	B6.C-H-2bm9	B6 × BALB/c	K	116, 121
<i>bm10</i>	<i>H-2bj</i>	B6.C-H-2bm10	B6 × BALB/c	K	165
<i>bm11</i>	<i>H-2bk</i>	B6.C-H-2bm11	B6 × BALB/c	K	77
<i>bm13</i>	<i>H-2bn</i>	B6.C-H-2bm13	B6 × BALB/c	D	
<i>bm14</i>	<i>zw42</i> , <i>H-2bo</i>	B6.C-H-2bm14	B6.C-H (z-w42)	D	
<i>dm1</i>	<i>M504</i> , <i>H-2da</i>	B10.D2-H-2dm1	B10 × B10.D2	D	
<i>dm2</i>	<i>H-2db</i>	BALB/c-H-2dm2	BALB/c	L	
<i>dm3</i>	<i>H-2dc</i>	B6.C-H-2dm3	B6 × BALB/c	D	
<i>dm4</i>	<i>H-2dd</i>	C.B6-H-2dm4	B6 × BALB/c	K	
<i>fm1</i>	<i>M506</i> , <i>H-2fa</i>	A.CA-H-2fm1	A.CA × A	K	
<i>fm2</i>	<i>FB</i> , <i>H-2fb</i>	B10.M-H-2fm2	B10.M × B10.R	D	
<i>km1</i>	<i>M523</i> , <i>H-2ka</i>	CBA-H-2km1	CBA	K	

довательности аминокислот локализованы в нескольких положениях в молекуле H-2, различных для разных мутаций. Поскольку все мутации были обнаружены благодаря их влиянию на отторжение трансплантата кожи, становится очевидным, что способность антигенов класса I вызывать отторжение трансплантата может изменяться под действием детерминант, расположенных в различных участках молекулы. Вначале считалось, что большинство мутаций можно определять лишь в функциональных тестах, таких, как отторжение трансплантата кожи или индукция клеточного иммунитета. Однако теперь уже ясно, что некоторые мутации обнаруживаются по избирательной потере эпитопов, выявляемых моноклональными антителами. Поэтому анализ мутантов предоставляет изящный способ определения взаимосвязи между аллореактивностью (на серологическом и клеточном уровне) и конкретными участками молекулы класса I. Многие мутации проявляют себя как элементы рестрикции реактивности Т-клеток против измененных «своих» антигенов, поэтому такие мутанты могут служить перспективной моделью для анализа тонкой специфичности реакций с участием Т-клеток [41].

13.4.3. Локусы класса II

13.4.3.1. Компоненты

Локусы класса II обнаружены лишь в двух I-областях, A и E. Продукты этих локусов у мышей называются антигенами Ia. Название Ia отражает тот факт, что гены, кодирующие эти антигены, картированы в одной области с генами Ir (отсюда Ir-associated или Ia-антигены) [42]. В настоящее время ясно, что эти антигены имеют много других одинаковых свойств; в то же время в области есть другие локусы, не кодирующие молекулы класса II. Поэтому применительно к мышам термин «антигены Ia» стал синонимом понятия «продукты локусов класса II», и мы будем использовать оба этих термина как равнозначные.

13.4.3.2. Химическое строение

Каждая молекула Ia состоит из двух нековалентно связанных гликопротеинов. Более тяжелая цепь (альфа-цепь) имеет мол. массу около 35 000 Да, а более легкая (бета-цепь) — около 28 000 Да. В отличие от ситуации с антигенами класса I, где только тяжелая цепь кодируется генами MHC, обе цепи класса II кодируются в областях I. Антигенные специфичности, картированные в области A, называют антигенами I-A, а картированные в области E — антигенами I-E. Однако недавно выяснилось, что бета-цепи обоих антигенов кодируются в области A, в то время как альфа-цепи кодируются в областях, имеющих соответствующие буквенные обозначения [43, 44]. Такая ситуация изображена на рис. 13.10. Кроме того, полиморфизм альфа-цепей, по-видимому, крайне ограничен; в то же время бета-цепи очень полиморфны, так что аллоантигенные специфичности определяются, вероятно, в основном бета-цепями.

Положение еще больше осложняется тем обстоятельством, что не все гаплотипы H-2 экспрессируют антигены области E [43, 45]. Например, антигены E не определяются в гаплотипах H-2^b, H-2^s и H-2^q. Тем не менее у гибридов F₁, полученных скрещиванием этих гаплотипов с экспрессирующими гаплотипами, наблюдается экспрессия новых, гибридных антигенных специфичностей, включающих компонент от неэкспрессирующих родителей. Исходя из этого, можно предположить, что неэкспрессирующие гаплотипы имеют ген E_β в области A, но экспрессия соответствующих антигенов не происходит потому, что эти гаплотипы не способны продуцировать молекулы E_α. Таким образом признак,

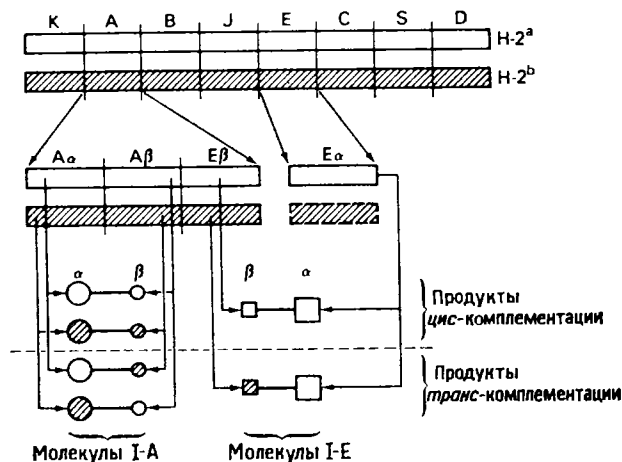


Рис. 13.10. Формирование молекул класса II путем альфа-бета-комплементации.

Как показано на рисунке, в результате образования связей между альфа- и бета-цепями разных гаплотипов у животных F_1 могут экспрессироваться гибридные молекулы, не имеющиеся ни у одного из родителей (продукты *транс-комплементации*). Это явление легче всего обнаружить в случае антигенов I-E; некоторые гаплотипы, как, например, $H-2^b$, вообще не экспрессируют I-E, поскольку не происходит образования альфа-цепи. Поэтому животные F_1 , у которых может происходить *транс-комплементация*, экспрессируют полный набор детерминант I-E, закодированных в соответствующей бета-цепи.

детерминируемый в области E, представляет собой экспрессию (или отсутствие экспрессии) молекул I-E в зависимости от образования (или нарушения образования) α -цепи. Феномен экспрессии «новых» антигенов у гибридов получил название *транскомплементации* [46, 47]; пример транскомплементации в случае гетерозиготы $H-2^a \times H-2^b$ приведен на рис. 13.10. Пример выявления транскомплементации в цитотоксическом тесте проиллюстрирован на рис. 13.11.

13.4.3.3. Распределение по тканям

В отличие от кодируемых в областях K и D антигенов класса I, которые представлены практически во всех тканях, антигены Ia имеют более ограниченное распределение. В периферических лимфоидных тканях, которые в целом

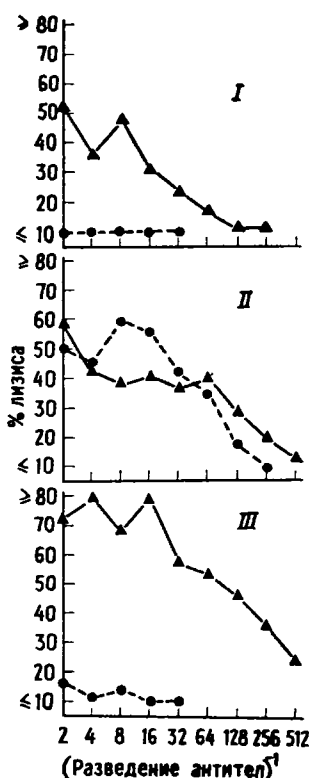
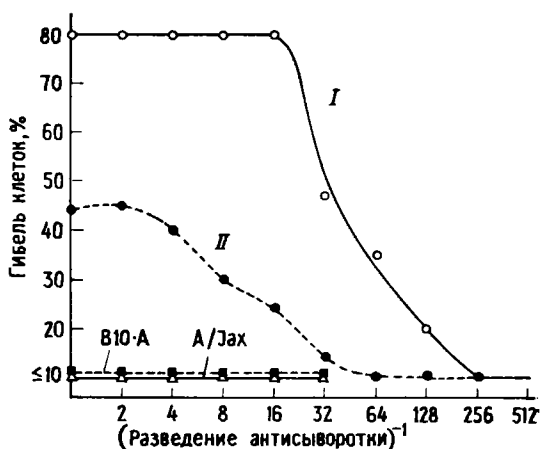


Рис. 13.11. Пример выявления *транс-комплементации* с помощью моноклональных антител 17-3-3S. Эти антитела выявляют специфичность Ia.22, являющуюся продуктом *транс-комплементации* бета-цепи гаплотипа $H-2^b$ и альфа-цепи гаплотипа $H-2^d$. I — B6, II — $(B6 \times DBA/2) F_1$, III — DBA/2. Знак $\blacktriangle$ соответствует A·TH-анти-A·TL, знак $\bullet$ — 17-3-3. ([47]; печатается с разрешения.)

являются самым богатым источником антигенов МНС, антигены Ia экспрессируются главным образом на В-клетках и некоторых макрофагах. Такое ограниченное распределение, видимо, объясняет, почему антигены Ia не были обнаружены с помощью анти-Н-2-сывороток в ранних исследованиях серологии Н-2. Пример цитотоксического теста, выявляющего в аллоиммунной сыворотке антитела против Н-2К и Ia, представлен на рис. 13.12. В то время как антитела против Н-2 убивают практически все лимфоидные клетки-мишени, антитела

Рис. 13.12. Определение цитотоксической активности аллоиммунной сыворотки в тесте комплементзависимой цитотоксичности.

Мишени — клетки селезенки. Тестируемая сыворотка (B10.A-анти-B10.D2) выявляет на мишенях B10.D2 как антигены Н-2, так и антигены Ia; на мишенях C57Bl/10 сыворотка выявляет лишь антигены Ia. I — B10.D2, II — C57Bl/10Sn.



против Ia убивают в основном В-клетки; в результате в кривой цитотоксичности появляется плато неполного лизиса мишеней. В этом конкретном опыте была использована популяция клеток селезенки, где В-клетки составляют 50% всех лимфоидных клеток. Если в качестве мишеней использовать лимфоциты периферической крови или клетки лимфатических узлов, плато кривой цитотоксичности будет располагаться на более низком уровне — соответственно около 25 и 15%. В ранних работах по анализу цитотоксических антител такие реакции неполного лизиса наблюдались часто, но их объясняли «слабой перекрестной реактивностью» или вообще игнорировали. Поскольку антигены Ia не экспрессировались на эритроцитах, они не обнаруживались при серологическом типировании в реакции гемагглютинации. Лишь в результате анализа соответствующих рекомбинантных линий, когда удалось картировать ответственные за неполный лизис антигены в области I, стало ясно, что реакции неполного лизиса отражают существование отдельной группы антигенов клеточной поверхности.

Данные о распределении антигенов Ia в других тканях остаются противоречивыми. Имеются сообщения об экспрессии антигенов Ia на субпопуляциях тимоцитов, периферических Т-лимфоцитах, некоторых эпителиальных клетках, клетках почки и других клеточных популяциях. Однако определяемое на этих тканях количество антигенов Ia значительно меньше, чем количество Ia на В-клетках, и остается неясным, связана ли экспрессия Ia с эндогенным синтезом в этих клеточных популяциях или клетки сорбируют антигены, выработанные другими клетками. Создается впечатление, что тимоциты могут как получать антигены Ia от других клеток тимуса, так и эндогенно продуцировать их в небольших количествах [48]. Поэтому избирательность распределения антигенов Ia по тканям имеет, может иметь, скорее количественный, чем качественный характер. Не исключено, что многие ткани экспрессируют Ia в неболь-

ших количествах, в то время как для В-клеток и макрофагов характерен высокий уровень экспрессии. Неизвестно, играют ли функциональную роль малые количества Ia, экспрессируемые на других тканях.

13.4.3.4. Серология

Сводные данные о серологических специфичностях Ia приведены в табл. 13.13. Как и в случае специфичностей антигенов класса I, цифровые обозначения присваивались антигенам Ia в соответствии с хронологической последовательностью их обнаружения и независимо от локализации антигенов в области A или E. Как явствует из табл. 13.13, полиморфизм антигенов Ia связан с областью A в гораздо большей степени, чем с областью E; подавляющее большинство известных специфичностей картировано в области A.

Таблица 13.13. Серологические специфичности антигенов Ia (по [49])¹

Гаплотип H-2	A		E	
	частная	общие	частная	общие
<i>b</i>	20*	3, 8*, 9*, 15*		
<i>d</i>	11	8*, 15*, 16	23	7*
<i>f</i>	14	1, 5, 17*, 18		
<i>k</i>	2*	1, 3, 15*, 17*, 18, 19*	22*	7*
<i>p</i>	21	5, 13*		7*
<i>q</i>	10*	3, 5, 9*, 13*, 16		
<i>r</i>		1, 3, 5, 12, 17*, 19*	22*	7*
<i>s</i>	4	5, 9*, 12, 17*, 18		

¹ Специфичности, отмеченные звездочкой, были определены с помощью как антисывороток, так и моноклональных антител (например, Ia.7 и Ia.m7).

² Ia.22 была открыта как частная специфичность гаплотипа H-2^k, но недавно эта специфичность также была найдена у H-2^r. Частные специфичности гаплотипов H-2^k и H-2^r пока не обозначены номерами.

Особенность серологии антигенов Ia, вызывавшая вначале удивление исследователей, заключалась в том, что все линии можно было разделить на Ia.7-положительные и Ia.7-отрицательные. Положительные линии экспрессировали также другие антигены I-E, в отрицательных же линиях отсутствовали альтернативные аллельные специфичности. Этот феномен сегодня легко объяснить с точки зрения химической структуры антигенов Ia, о которой мы уже говорили (см. рис. 13.10). Ia.7-положительные линии экспрессируют цепь E_α, а Ia.7-отрицательные линии не экспрессируют ее. По последним данным неспособность продуцировать α-цепь объясняется изменением структурного гена E_α; вследствие такого изменения ген, вероятно, не может быть экспрессирован [50]. Если α-цепь не экспрессирована, не образуются молекулы I-E и возникает «нулевой» аллель. До настоящего времени не выявлено практически никакого разнообразия α-цепей, экспрессируемых Ia.7-положительными гаплотипами. Наоборот, E_β-цепи отличаются значительным полиморфизмом, и, по-видимому, именно с β-цепями связано разнообразие Ia-специфичностей области E (кроме специфичности Ia.7). Возможно, Ia.7 является детерминантой α-цепи, выявляемой в результате иммунизации линий, не экспрессирующих I-E, или

же, наоборот, Ia.7 может быть общей детерминантой всех β -цепей, но для ее экспрессии необходима ассоциация с α -цепью.

Именно зависимость от экспрессии α -гена привела к картированию специфичностей I-E в области E, несмотря на то, что полиморфная β -цепь в действительности кодирована в области A. Для определения профиля специфичностей конкретного гаплотипа проводят анализ линии, имеющей область A этого гаплотипа и экспрессирующей α -цепь области E [51]. В случае гаплотипов, не экспрессирующих молекулы I-E, для этой цели можно найти рекомбинанта между областями A и E или получить гибридов F₁ с гаплотипом, экспрессирующим цепь E _{α} . Так, гаплотипы *b*, *k*, *r* и *s* (см. табл. 13.14) имеют ген цепей E _{β} , обуславливающий образование молекул Ia с общей для этих гаплотипов специфичностью Ia.22; эта специфичность отсутствует в гаплотипах *d*, *f*, и *q*. Наоборот, специфичность Ia.23 формируется цепями E _{β} гаплотипа H-2^d и отсутствует в других гаплотипах.

Таблица 13.14. Комплементация A-E в случае экспрессии Ia.22 и Ia.23. [47, 51, 52], с изменениями

Специфичность	Аллели A		Аллели E 1)	
	+	-	+	-
Ia.22	<i>b</i> <i>k</i> <i>r</i> <i>s</i>	<i>d</i> <i>f</i> <i>p</i> <i>q</i> <i>u</i>	<i>d</i> <i>k</i> <i>p</i> <i>r</i> <i>u</i>	<i>b</i> * <i>f</i> * <i>q</i> * <i>s</i> *
Ia.23	<i>d</i>	<i>b</i> <i>f</i> <i>k</i> <i>p</i> <i>q</i> <i>r</i> <i>s</i> <i>u</i>	<i>d</i> <i>k</i> <i>p</i> <i>r</i>	<i>b</i> * <i>f</i> * <i>q</i> * <i>s</i> * <i>u</i>

1) Аллели E, отмеченные звездочкой, видимо, являются «нулевыми».

Подобно антигенам класса I, антигены Ia областей A и E можно подразделить на общие и частные специфичности, хотя до сих пор частные специфичности определены не для всех гаплотипов. В отличие от ситуации с антигенами класса I общие специфичности с перекрестной реактивностью для продуктов разных аллелей областей A и E встречаются крайне редко. Большинство моноклональных антител против Ia также специфичны для какой-либо одной области, хотя недавно появилось сообщение о серии моноклональных антител, перекрестно-реагирующих с антигенами I-A и I-E [53]. Поэтому, хотя наблюдаемые перекрестные реакции свидетельствуют о том, что гены продуктов A и E происходят от общего гена-предшественника, они, по-видимому, претерпели больше независимых изменений, чем гены класса I. Можно ожидать, что в отличие от антигенов класса I, для которых знание аминокислотной последовательности не дает возможности отнести антиген к конкретной области (K или D), дальнейшие работы по секвенированию позволят выявить последовательности, специфичные соответственно для A или E. Известные сейчас результаты секвенирования антигенов класса II человека и мыши подтверждают это предположение [54].

13.4.3.5. Функциональные свойства

С антигенами Ia связаны многочисленные функции, проявляющиеся как в аллогенных реакциях, так и в физиологическом взаимодействии клеток при иммунном ответе. К аллореактивным функциональным признакам относятся стимуляция реакции СКЛ, энергичная стимуляция выработки гуморальных антител, реакции «трансплантат против хозяина» и в некоторых случаях отторжение трансплантата. Хотя до сих пор неясно, связаны ли эти свойства с узнаванием аналогичных или разных детерминант антигенов класса II, большинство исследователей приходит к выводу, что все детерминанты расположены на одних и тех же молекулах.

Среди физиологических реакций иммунного ответа, связанных с антигенами Ia, следует отметить большое число феноменов, включающих в себя взаимодействие между Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами и макрофагами. В большинстве случаев чужеродные антигены должны быть презентированы (представлены) Т-клеткам антиген-презентирующими клетками (субпопуляцией макрофагов); при этом происходит распознавание Т-клетками комплекса чужеродных антигенов и антигенов Ia на поверхности антиген-презентирующих клеток. В результате Т-клетка, получившая информацию об антигене (примированная антигеном) на презентирующей клетке, имеющей конкретный набор антигенов Ia, в будущем «узнает» этот антиген лишь в прямой или ассоциативной связи с таким же набором антигенов Ia. Таким образом, на уровне распознавания антигена молекулы Ia играют такую же роль в МНС-рестрикции, как антигены класса I на уровне эффекторов СМЛ, когда происходит распознавание комплекса антигена и «своих» антигенов класса I. Феномен МНС-рестрикции клеточных взаимодействий при иммунном ответе детально рассматривается в гл. 15.

Другая большая группа функций, связанных с Ia, относится к действию генов *Ir*. Поскольку в большинстве случаев иммунный ответ включает в себя взаимодействия между антиген-презентирующими клетками, Т-клетками и В-клетками, а эти взаимодействия протекают через «узнавание» антигенов в сочетании с молекулами класса II, было бы логично предположить, что дефект презентирования антигена объясняется неспособностью определенных антигенов Ia служить рестриктивным элементом для распознавания антигена. Такой дефект будет соответствовать определению гена *Ir*, так как он приведет к антиген-специфической ареактивности. В то же время дефект будет локализоваться в пределах соответствующей области *I*, поскольку он связан с антигенами Ia. В самом деле, имеются убедительные доводы в пользу того, что некоторые из генов, кодирующих антигены Ia, одновременно ответственны за феномен генов *Ir*; такие данные детально рассматриваются в гл. 16. Однако, как будет показано далее, не все гены *Ir* расположены в областях *I*, кодирующих антигены Ia, поэтому хотя гены, кодирующие антигены Ia, вероятно, являются генами *Ir*, далеко не все гены *Ir* кодируют антигены Ia.

13.4.3.6. Молекулярная биология

Проблема выделения генов локусов класса II разработана в меньшей степени, чем в случае локусов класса I, хотя в последнее время эта область быстро развивается и уже наблюдается значительный прогресс. Создается впечатление, что в отличие от локусов класса I общее число локусов класса II не намного превышает число экспрессируемых локусов. Современные представления о генах класса II подробно изложены в гл. 14.

13.4.3.7. Мутанты класса II

К настоящему времени описана лишь одна мутация гена класса II, *bm 12* [55]. Мутант был обнаружен в результате скрининга такого же типа, как и при выявлении мутаций класса I, а именно по отторжению трансплантата кожи. Мутация *bm 12* отличалась от других мутаций $H-2^b$, поскольку по результатам трансплантационного теста она локализовалась в отдельной группе комплементации. Так, гибриды между мутантом *bm12* и другими мутантами $H-2K^b$ не отторгали трансплантат кожи $H-2^b$ (т. е. разные группы комплементации), в то время как гибриды между другими мутантами отторгали трансплантат «дикого типа» (одна группа комплементации). Создание рекомбинантного гаплотипа у линии B10.MBR (см. табл. 13.7) позволило картировать участок, ответственный за особенности отторжения трансплантата; оказалось, что мутация произошла в гене, расположенном правее области $H-2K$ [56]. У мутанта *bm12* также оказались измененными многие серологические специфичности Ia [57], причем впоследствии было показано, что целый ряд моноклональных антител против $I-A^b$ вообще не реагирует с лимфоидными клетками мутанта [58].

Исследование этой мутантной по Ia линии позволило выявить многочисленные корреляции между функциональными свойствами области I и мутантных молекул Ia. Сейчас известно, что мутация затронула цепь A_β продукта локуса A и не затронула цепи A_α [59, 60]. Помимо особенностей, связанных с отторжением трансплантата и серологическими специфичностями, у мутанта были обнаружены также изменения реактивности в СКЛ, некоторых функций генов *Ir*, и рестрикции презентации антигенов. Если исходить из предположения, что мутация затронула лишь одну молекулу, то можно прийти к выводу, что все перечисленные свойства являются функцией одной и той же молекулы.

13.4.4. Другие локусы, сцепленные с MHC

13.4.4.1. Область I

В результате анализа рекомбинантов область I была разделена на пять участков (рис. 13.9); только в двух из них, в областях A и E, как уже говорилось, были обнаружены локусы класса II. Учитывая локализацию областей B, J и C в пределах области I и их вероятное участие в регуляции иммунного ответа, некоторые авторы относят эти локусы к классу II. Однако данные о структурном сходстве продуктов этих трех локусов с продуктами областей A и E немногочисленны, и, по-видимому, имеет смысл рассматривать каждую из областей B, J и C как самостоятельную единицу, и не пытаться классифицировать их как группу до тех пор, пока не будет получена новая информация о структуре генов, входящих в состав этих областей.

13.4.4.2. Область B

Область B впервые была обнаружена при анализе рекомбинанта B10.A (4R); рекомбинация отделила ген иммунного ответа (*Ir*) на IgA-миеломы от гена *Ir* на IgG-миеломы [61]. Для мышей B10.A ($H-2^a$) характерен высокий уровень иммунного ответа на белки IgA и слабый ответ на белки IgG, в то время как мыши B10 ($H-2^b$) имеют противоположный фенотип. Поскольку у мышей B10.A (4R) наблюдался высокий уровень иммунного ответа на оба класса миеломных белков, был сделан вывод, что данная линия унаследовала от родитель-

ских линий два неаллельных гена *I_r*. Поэтому область *I* была разбита на две субобласти, впоследствии названные *I-A* и *I-B*. Последующее изучение области *I* справа от *I-B* (см. ниже) позволило установить рекомбинационные границы по обе стороны от области *B*.

Дальнейшие исследования, приведенные в нескольких лабораториях, показали, что в области *B* сосредоточен целый ряд генов *I_r*, в том числе гены, определяющие фенотипы высокого и низкого уровня иммунного ответа [98—101]. В свое время было высказано предположение о том, что эффект этих генов *I_r* может быть обусловлен активностью двух генов, одного в области *A* и одного — в области, расположенной справа от *B*, причем специфические комбинации аллелей в этих двух областях могут быть условием, необходимым или достаточным для поддержания соответствующего фенотипа иммунного ответа [62]. Однако, как ни привлекательна эта гипотеза, до сих пор не удалось доказать экспериментально ее правомочность в отношении большинства антиген-специфических реакций, контролируемых областью *B*. Несмотря на многочисленные попытки, до настоящего времени не удалось серологически идентифицировать какие-либо продукты области *I-B*. Поэтому было высказано предположение, что локусы этой области не кодируют продуктов, экспрессируемых на мембране клеточной поверхности, а несут, по-видимому, регуляторную функцию. В качестве рабочей формулировки автор рассматривает область *B* как область, определяемую по функции генов *I_r*, структурная основа которых неизвестна.

13.4.4.3. Область *J*

В течение многих лет линии B10.A (3R) и B10.A (5R) считались идентичными (рис. 13.8), поскольку они были одинаковыми по всем доступным для типирования антигенам классов I и II. Однако в 1976 г. Мерфи и др. [63] сообщили о том, что антитела, полученные в результате реципрокных иммунизаций между этими линиями, способны в присутствии комплемента лизировать супрессорные Т-клетки. Впоследствии эти результаты были подтверждены многими другими исследователями, работавшими с различными системами Т-супрессоров. Поскольку число Т-супрессоров в нормальных популяциях лимфоидных клеток очень мало, анализ антигенов был сопряжен с большими трудностями, вытекающими из необходимости в функциональных тестах для определения активности супрессорных клеток. В последнее время были созданы клонированные линии Т-супрессоров; использование этих линий позволит выделить и охарактеризовать продукты области *J* [64]. Недавно появились сообщения о линиях гибридом, секретирующих моноклональные антитела против *I-J*; наличие таких антител должно значительно облегчить исследование области *J* [65, 66]. Продукты области *J* обнаружены на множестве супрессорных факторов, но опять-таки в большинстве случаев для определения последних необходимы функциональные тесты, причем факторы эти присутствуют в очень малых количествах. Ввиду всего этого химическое строение продуктов области *J* до сих пор изучено очень слабо [64]. Имеются некоторые указания на то, что продукты области *J*, выявляемые на поверхности Т-супрессоров и на супрессорных факторах, отличаются друг от друга; остается неясным, сколько продуктов на самом деле кодирует область *J*.

13.4.4.4. Область *C*

Область *C* была исходно определена по серологической специфичности Ia.6, которая выявлялась на лимфоидных клетках линий *H-2^d* и *H-2^a*, и отсутствовала у линии *H-2^k* [67]. На этом основании предполагалось, что в происхож-

дения гаплотипа $H-2^a$ участвовала рекомбинация между гаплотипами $H-2^h$ и $H-2^d$, в результате которой линия $H-2^a$ получила область C от линии $H-2^d$ (табл. 13.7). Впоследствии серологическое выявление области C было поставлено под сомнение, поскольку воспроизвести получение соответствующих антител не удавалось. Однако недавно появилось сообщение о получении антисыворотки, специфически реагирующей с Ia.b, хотя, согласно имеющимся данным, эти антитела реагируют с субпопуляцией Т-клеток и не реагируют с В-клетками [68]. Поэтому, если эти результаты подтвердятся, все же не следует относить область C к классу II и скорее следует считать, что она содержит самостоятельный локус.

За первым сообщением об области C последовали многочисленные функциональные исследования, подтвердившие существование данной области. Эти работы касались локализации генов *Ir*, детерминант, стимулирующих СКЛ, и детерминант супрессорных факторов. Продукты области C до сих пор не охарактеризованы.

13.4.4.5. Область S

Область S была определена при изучении количества определенного сывороточного белка, выявляемого в реакции иммунопреципитации с гетерологической антисывороткой против сывороточных белков мыши. Оказалось, что количество белка, названного Шреффлером и Оуэнсом [69] S_s , варьирует в сыворотке мышей разных линий, причем уровень его содержания (низкий или высокий) детерминирован генами, картируемыми между специфичностями $H-2$. Таким образом была определена область S . Почти все гаплотипы $H-2$ несут аллель высокого содержания S_s (S_s^h), и лишь в гаплотипе $H-2^h$ имеется аллель низкого содержания S_s (S_s^l). Поэтому для типирования S_s можно было использовать только рекомбинантов между аллелем k и другими аллелями.

Впоследствии в результате иммунизации мышей S_s^l фракцией сыворотки, обогащенной S_s , был обнаружен другой маркер области S . Определяемый такой аллоиммунной сывороткой маркер Slp присутствовал у мышей с гаплотипом (Slp^a) и отсутствовал у мышей с гаплотипом (Slp^0) [70]. Обозначение Slp расщепливается как белок, ограниченный полом (sex-limited protein). В этом названии отражен тот факт, что маркер Slp , как правило, выявляется лишь у самцов. Ограничение экспрессии, связанное с полом, видимо, обусловлено влиянием гормонов.

В течение многих лет структура и функции продуктов области оставались неизвестными. Недавно, однако, белок S_s был идентифицирован как компонент C_4 системы комплемента мыши. Как будет отмечено далее в настоящей главе, кодирующие варианты компонента C_4 комплемента человека, также сцеплены с *MHC*. Таким образом, ассоциация может иметь функциональное значение, но в любом случае ее причины остаются неизвестными.

13.4.4.6. Антигены Qa и Tla

Бойз и Олд [71] тщательно изучили серологически определяемые антигены клеточной поверхности, кодируемые генами, расположенными справа от комплекса $H-2$. Локус получил название *Tla*, поскольку первоначально антигены обнаруживались главным образом на клетках тимуса и Т-клеточных лейкозов, но не в других лимфоидных популяциях (отсюда название Thymus-leukemia antigens — тимус-лейкозные антигены). Серологические специфичности антигенов *Tla* получили название *TL* и были обозначены номерами (см.

примечание к табл. 13.15). Создание ряда конгенных и конгенных рекомбинантных линий дало возможность картировать гены *Tla* относительно комплекса *H-2*. С помощью этих линий также были получены специфические антисыворотки против антигенов *Tla*.

Таблица 13.15. Распределение аллелей *Tla* и *Qa* по линиям (по [72])

Линия	Гаплотип <i>H-2</i>	<i>Tla</i> ^b	<i>Qa-1</i>	<i>Qa-2</i>	<i>Qa-3</i>	<i>Qa-4</i>	<i>Qa-5</i>
A	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	?	<i>b</i>
A- <i>Tla</i> ¹	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	?	<i>b</i>
C57BL/6	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
B6.K1	<i>b</i>	<i>b</i>	?	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
B6.K2	<i>b</i>	<i>b</i>	?	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
BALB/c	<i>d</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	?	<i>b</i>
A.CA	<i>f</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
AKR	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
B6-H-2 ^k	<i>k</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
B10.BR	<i>k</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
C3H	<i>k</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
DBA/1	<i>q</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	?	?
A.SW	<i>s</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
A.TL	<i>t1</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	?	<i>b</i>
A.TH	<i>t2</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	?	<i>b</i>

¹ Аллели *Tla* следующим образом определяются специфичностями TL; *a* = 1, 2, 3, 5, 6; *b* = нулевая специфичность; *c* = 2; *d* = 1, 2, 3.

Помимо необычного распределения по тканям антигенам *Tla* присущи некоторые другие интересные особенности. Так, было показано, что в отличие от других антигенов МНС эти антигены способны изменять свое расположение в клеточной мембране или «модулировать» в присутствии специфических антител при температуре 37°C [73]. После такой модуляции добавление компонента не приводит к лизису клетки. Эта особенность лежит в основе тестирования антигенов *Tla* и свидетельствует об их независимости от других систем антигенов. Кроме того, была выявлена обратная зависимость между количеством антигенов *Tla* и *H-2D* на поверхности тимоцитов. После модуляции антигенов *Tla* экспрессия *H-2D* усиливается. Более того, методом блокирования антигенов было показано, что связывание антител с антигенами *Tla* ингибирует связывание антител с антигенами *H-2D*, но не с *H-2K*. Эти данные привели к выводу об особой пространственной взаимосвязи между антигенами *Tla* и *H-2D* на мембране *Tla*-положительных клеток.

По биохимическим данным молекула *Tla* состоит из тяжелой (с мол. массой 45кДа) и легкой цепей; легкая цепь идентична бета₂-микроглобулину [74]. Таким образом, по химическому составу эти антигены имеют большое сходство с антигенами класса I. Следовательно, можно думать, что локус *Tla* и локусы класса I имеют общий ген-предшественник. Тем не менее ввиду особого распределения по тканям и обнаруженных функциональных различий локус *Tla* не следует, по-видимому, относить к локусам класса I.

Локус *Tla* картирован правее *H-2D* на расстоянии приблизительно 1,5 ед (рис. 13.9). Между локусами *H-2D* и *Tla* недавно была обнаружена серия локусов, названных локусами *Qa* [72]. Как показано в табл. 13.15, в настоящее вре-

мя постулируется существование пяти локусов *Qa*, обозначаемых *Qa-1* — *Qa-5*. Антигены *Qa-1* были обнаружены с помощью аллоиммунных сывороток при перекрестной иммунизации конгенных линий. Локус *Qa-1* не удалось отделить от локуса *Tla* рекомбинацией; фактически распределение этого локуса по линиям совпадает с распределением антигенов *Tla* (табл. 13.15). Единственное, чем антигены *Qa-1* отличаются от антигенов *Tla*, — это распределение по тканям, поскольку антигены *Qa-1* выявляются на субпопуляциях периферических Т-лимфоцитов. Поэтому не исключено, что антигены *Qa-1* и *Tla* представляют собой не продукты разных локусов, а разные стадии дифференцировки продукта одного и того же гена.

С помощью *Tla*-конгенных рекомбинантных линий (табл. 13.15) локус *Qa-2* был картирован между локусами *H-2D* и *Tla*. Как и антигены *Qa-1*, антигены *Qa-2* определяются аллоиммунными сыворотками, полученными в результате перекрестных иммунизаций соответствующих конгенных линий. Эти антигены распределены по линиям иначе, чем антигены *Tla*, — еще одно подтверждение того, что они представляют продукты отдельного локуса. Антигены *Qa-2* найдены на 65% клеток лимфатических узлов, 15—35% тимоцитов, а также на клетках некоторых Т-клеточных лейкозов.

Локус *Qa-3* также был определен с помощью аллоиммунной сыворотки. Он не отделяется от локуса *Qa-2* рекомбинацией, но имеет несколько иное распределение по линиям (табл. 13.15) и, видимо, иное распределение по тканям. Антигены обнаружены на 30—50% клеток лимфатических узлов, главным образом на Т-клетках, но также и на некоторых В-клетках. Антисыворотки, реагирующие как с антигенами *Qa-2*, так и с *Qa-3*, преципитировали молекулы, которые, подобно антигенам *Tla*, были гомологичны молекулам класса I.

Локусы *Qa-4* и *Qa-5* были определены на основе особенностей реакции моноклональных антител, полученных при иммунизациях АКР-анти-В6. Данные по распределению антигенов по линиям и анализ *Tla*-рекомбинантных линий позволили предположительно локализовать эти локусы между *H-2D* и *Tla*, но их относительное положение на карте остается неясным. Антигены *Qa-4* и *Qa-5* обнаруживают приблизительно на 75 и 35% Т-клеток селезенки. По-видимому, антитела против *Qa-4* также реагируют с некоторыми В-клетками.

Как видно из вышеизложенного, антигены, кодируемые этими локусами, пока еще изучены недостаточно полно. Вероятно, в некоторых случаях антигены представляют разные стадии дифференцировки продукта одного и того же локуса. Возможно также, что они являются продуктами многочисленных генов, часть которых (или все) возникла от генов-предшественников, общих с локусами класса I. В настоящее время проводятся интенсивные функциональные исследования популяций клеток, экспрессирующих эти антигены.

13.5. Комплекс *HLA*

13.5.1. Карта *HLA*

Современная генетическая карта комплекса *HLA* и тесно сцепленных с ним генов приведена на рис. 13.13. Многочисленные компоненты комплекса *HLA* гомологичны локусам комплекса *H-2*. Тем не менее для получения данных, лежащих в основе современного уровня знаний о карте *HLA*, исследователи были вынуждены использовать иные методологические подходы, чем при изучении локусов *H-2*. Различия методов вытекают главным образом из необходимости анализировать не инбредные линии, а большие популяции. Кроме того, в слу-

чае *HLA* человека резко ограничиваются возможности манипулировать экспериментальными системами. При разработке карты *HLA* эти различия отразились главным образом в своеобразии методов определения серологических спе-

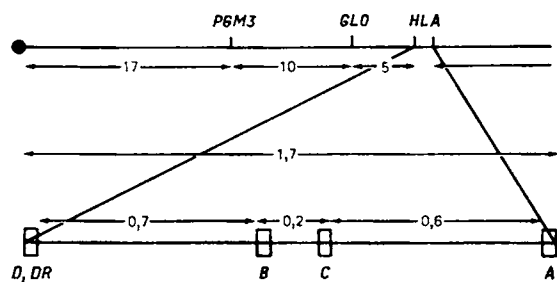


Рис. 13.13. Линейная карта комплекса *HLA* (хромосома 6).

цифичностей и в использовании для генетического анализа информации о семьях и популяционных данных. В последующих разделах этой главы мы рассмотрим обе эти проблемы в отдельности.

13.5.1.1. Серологический анализ

Впервые антигены *HLA* были обнаружены серологическими методами в конце 50-х годов: в клинических исследованиях по типированию крови клиницисты столкнулись с необычным характером реакций сыворотки больных, подвергающихся неоднократной гемотрансфузии. Было обнаружено, что сыворотка таких больных часто агглютинирует лейкоциты неродственных доноров и что особенности такой агглютинации отражают наличие в человеческой популяции каких-то доступных определению антигенов. В начале 60-х годов стало ясно, что антитела против *HLA* можно найти в сыворотке многорожавших женщин. Были организованы обширные программы скрининга для получения таких сывороток. Кроме того, в начале 60-х годов метод лейкоагглютинации уступил место цитотоксическому тесту, который оказался более воспроизводимым и удобным для повсеместного применения.

Исследователи разных стран работали с разными панелями сывороток и клеток, что привело к возникновению различной терминологии. К счастью, были проведены серии рабочих совещаний, во время которых происходили обмен реактивами и параллельное тестирование на различных панелях клеток. В задачу таких совещаний входили стандартизация определения специфичностей *HLA* и выработка единой номенклатуры *HLA*.

Определение специфичностей *HLA* обычно включает в себя тестирование реактивными сыворотками большой панели клеток. Реакции каждой сыворотки с образцами клеток (компонентами панели) оценивают как положительные или отрицательные, затем с помощью компьютера вычисляют конкордантность (совпадение реакций) разных сывороток. Группе сывороток, имеющих высокую степень конкордантности по критерию χ^2 (т. е. выявляющих одинаковую специфичность или группу специфичностей), присваивают номер специфичности; полученные сыворотки сохраняют как стандарт сравнения для определения этой специфичности. Схематический пример такого анализа на панели клеток 18 неродственных доноров показан на рис. 13.14 [76]. Такая форма представления результатов тестирования панели была характерна для раннего этапа серологических исследований. С помощью этого теста было обнаружено пять различных вариантов реактивности, обуславливающих пять серо-

логических специфичностей: сыворотки 1, 2 3 и 4 выявляют специфичность, общую для доноров А-І. Кроме того, сыворотка 3 выявляет дополнительную специфичность донора J, с которой реагируют также сыворотки 8 и 9 и т. д. В этом тесте конкордантность некоторых сывороток, например 1—4, легко определяется визуально. Однако в случае тестирования большого числа образцов сывороток и клеток на панелях большего размера вместо визуальной оценки используется компьютерный анализ.

В первых исследованиях по скринингу все выявленные специфичности относились к продуктам класса I. Это объясняется тем, что анализ, как правило, проводили на лимфоидных популяциях периферической крови, в которых

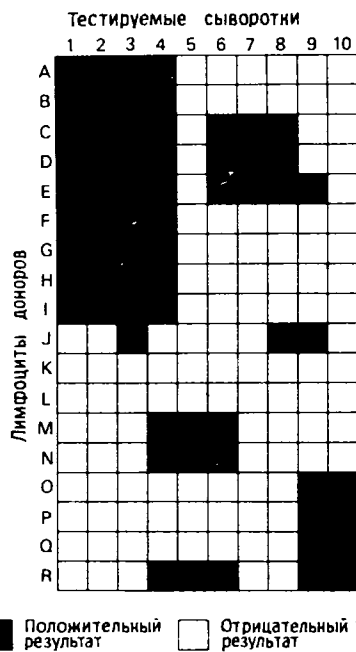


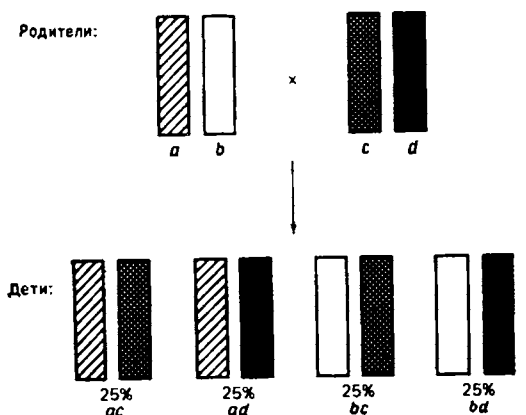
Рис. 13.14. Типирование лимфоцитов человека. Схематическое изображение результатов тестирования панели, состоящей из 10 сывороток многокративших женщин, на лимфоцитах-мишенях от 18 разных доноров. Визуальная оценка позволяет отметить пять отличных друг от друга вариантов реактивности.

преобладают Т-лимфоциты. В начале 70-х годов стало очевидным, что специфичности можно разделить на две серии, HLA-A и HLA-B, таким образом, что индивидуум наследует от каждого из родителей не более одной специфичности из каждой серии. В начале 70-х годов была открыта еще одна, самостоятельная серия специфичностей класса I, HLA-C, обладающая гораздо меньшим полиморфизмом. Вскоре после этого была обнаружена серия аллоантигенов В-клеток, кодируемая генами, сцепленными с *HLA*. Эти антигены, получившие название HLA-DR, представляют собой продукты локусов класса II человека. Серология продуктов классов I и II детально рассматривается ниже в этой части. Здесь мы упоминаем их для того, чтобы показать, какой сложный анализ необходимо было произвести для определения специфичностей каждого из этих локусов методом серологического скрининга. Очевидно, что лишь путем объединения усилий и взаимной договоренности между исследователями этой области удалось разработать адекватную панель сывороток для работы по определению серологии HLA.

13.5.1.2. Генетический анализ

Ввиду крайнего полиморфизма, свойственного каждому из локусов *HLA*, практически все члены такой аутбредной популяции, как человек, гетерозиготны по большинству, если не по всем локусам *HLA*. Поэтому, если у инбредных мышей генотип можно непосредственно определить типированием индивидуальных животных, при генетическом анализе сцепления у человека необходимо типировать параметры расщепления в семье. Поскольку частота рекомбинаций в пределах *MHC* сравнительно мала, можно в целом принять, что группы отличных друг от друга аллелей в различных сцепленных с *HLA* локусах, сегрегирующие вместе, представляют собой одну группу сцепления и составляют гаплотип. На рис. 13.15 приведена общая схема наследования *HLA*. Как показано на рисунке, если обозначить четыре интересующие нас хромосомы буквами *a*, *b*, *c*, *d*, то потомство можно будет отнести к одной из четырех возможных категорий. Иначе говоря, следует ожидать, что частота любого из четырех возможных генотипов в потомстве составит 25%. Последнее положение важно в клиническом аспекте, поскольку оно указывает, что любой сибс больного, нуждающегося в трансплантации, с вероятностью 25% будет иметь идентичный с ним набор антигенов *HLA* (т. е. будет идентичным по *HLA* донором). Поэтому при типировании *HLA* у членов одной семьи в клинических целях, как правило, достаточно, чтобы каждую из родительских хромосом, несущих гены *MHC*, можно было отличить по какому-либо одному маркеру. После этого можно надеяться, что если два сибса конкордантны по этим маркерам, то между ними существует идентичность по всему комплексу *MHC*. Характерный пример типирования *HLA* среди членов семьи представлен в табл. 13.16. Для получения информации о распределении генотипов в данной семье достаточно провести типирование по одному из многих полиморфных локусов, поскольку оба родителя были типированы по двум четко определяемым аллелям в каждом из локусов.

С другой стороны, именно исключения из этого общего характера наследования позволили получить информацию о сцеплении генов и построить карту *HLA*. Так же как и в ситуации с инбредными мышами, анализ кроссингове-



Вероятность идентичности гаплотипов (%)	Тип трансплантата Родитель-ребенок Сибс	Число идентичных гаплотипов		
		0	1	2
		0	100	0
		25	50	25

Рис. 13.15. Распределение гаплотипов *HLA* в семьях. Как видно из рисунка, можно ожидать, что 25% сибсов будут иметь одинаковый генотип *HLA* (любого из возможных вариантов).

Таблица 13.16. Типирование антигенов HLA у членов одной семьи¹⁾ (по [77])

Член семьи	Типируемые антигены локусов																				Условные обозначения аллелей				
	A				B				C				DR				Предполагаемый генотип								
																	A	B	C	DR/A		B	C	DR	
	1	2	3	9	5	7	8	12	1	2	4	1	2	3	7										
Отец	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A1	B8	C1	D3/A3	B7	C- ²)	D2			
Мать	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A2	B5	C2	D1/A9	B12	C4	D7			
Сибс 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A1	B8	C1	D3/A9	B12	C4	D7			
Сибс 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A1	B8	C1	D3/A2	B5	C2	D1			
Сибс 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A3	B7	C-	D2/A2	B5	C2	D1			
Сибс 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A1	B8	C1	D3/A9	B12	C4	D7			
																						a/b			
																						c/d			
																						a/d			
																						a/c			
																						b/c			
																						a/d			

- 1) Типирование вображаемой семьи путем проведения цитоксического теста на панелях с сыворотками против HLA-A, B, C, DR.
- 2) Знак «-» обозначает отсутствие какого бы то ни было идентифицируемого антигена.

Таблица 13.17. Рекомбинация внутри *NLA* на основании данных, приведенных в работе¹⁾ [77]

Член семьи	Типируемые антигены							Фенотип			Генотип					Условные обозначения аллелей	
	A1	A2	A3	B7	B8	B22	B27	C1	C2	A	B	C	B/A	C	B		
Отец	+	+	-	+	-	+	+	-	+	1	2	7	27	2	1	27	a/b
Мать	+	-	+	+	-	+	+	+	-	1	3	8	22	-	1	22	c/d
Сибс 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	3	22	27	1	2	22	b/d
Сибс 2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	1	3	7	22	1	1	22	a/d
Сибс 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	2	8	27	2	2	8	b/c
Сибс 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	3	22	27	1	1	22	a : b/d
Сибс 5	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1	1	7	8	-	-	8	a/c

1) Данные типирования показывают комбинацию между локусами A и C внутри HLA у субса 4.

ров в пределах *MHC* позволил составить линейную карту локусов *HLA*. В табл. 13.17 приведен пример типирования семьи, выявляющий происшедшую рекомбинацию. Как видно из таблицы, полученные результаты типирования всех членов этой семьи можно объяснить лишь рекомбинацией, происшедшей в хромосоме отца и отделившей аллели локуса *HLA-A* от аллелей остальных локусов. В результате анализа большого числа семей в разных частях мира была получена оценка частоты рекомбинаций между различными локусами, и на этой основе определены расстояния между разными локусами *HLA* (рис.13.13).

Недавно для анализа тонкой генетической структуры области *HLA* начали использовать другой подход, основанный на применении линий В-клеток, иммортализованных вирусом Эпштейна — Барр. На таких клетках проводят отбор мутаций, влияющих на экспрессию генов *HLA*. Обычно работа производится по следующей схеме: в исходной линии индуцируют мутации с помощью ионизирующего излучения или химического мутагена, затем отбирают варианты с измененной экспрессией антигенов *HLA* (как правило, используя метод комплементзависимой цитотоксичности) и проводят клонирование. Панели таких мутантов (с делециями) уже нашли успешное применение при картировании нового гена *SB* (см. далее). Можно ожидать, что мутантные клоны будут с успехом использованы для картирования новых генов и антигенов *HLA*. Логика исследования остается приблизительно такой же, как и при анализе рекомбинантов. Преимущества нового метода заключаются в том, что мутации всегда можно индуцировать; кроме того, становится доступным анализ множественных изменений в пределах одного гаплотипа. Ограниченность метода связана с тем, что анализ проводится на уровне лишь клеток одного типа (В-лимфоцитов), а не всей особи данного генотипа.

13.5.2. Локусы класса I

Ранее мы уже обсуждали свойства локусов класса I, и в особенности локусов класса I мыши. Многие из этих особенностей имеют точные аналогии среди спектра свойств локусов класса I человека, и читатель может почерпнуть соответствующую информацию в предыдущих разделах, содержащих сведения о распределении по тканям, функциональных свойствах и химическом строении антигенов класса I. Последний вопрос подробно рассматривается в гл. 14. Настоящий раздел посвящен главным образом серологии антигенов *HLA* класса I.

13.5.2.1. Компоненты

Три локуса *HLA* класса I получили название *A*, *B* и *C*. Их расположение относительно друг друга и прочих маркеров хромосомы 6 показано на рис. 13.13. Первыми были открыты локусы *A* и *B*. Они отличаются очень высоким полиморфизмом серологически выявляемых продуктов. Локус *C* был открыт позднее, его полиморфизм более ограничен. В пользу существования этих трех локусов класса I свидетельствуют две группы данных: а) наличие трех независимых серий антигенов, распределяющихся в семьях таким образом, что потомок получает от каждого родителя по одному аллелю каждой из трех серий, но никогда не получает от одного родителя более одного аллеля (табл. 13.16), б) происходящие время от времени рекомбинации внутри семьи, отделяющие аллели любого из локусов (как показано, например, в табл. 13.17).

Как явствует из рис. 13.5 и 13.13, взаимное расположение локусов классов I и II у человека отличается от расположения этих локусов у мыши; в геноме человека не найдено локусов класса II, расположенных между локусами класса

I. Такая организация локусов наблюдается также у многих других видов млекопитающих, и возможно, что мышь составляет исключение в этом отношении. С другой стороны, молекулярно-биологические исследования показали, что у человека, как и у мыши, имеются многочисленные гены класса I, хотя экспрессируются, по-видимому, лишь три локуса. Поэтому дальнейшие исследования, вероятно, покажут, что генетическая организация локусов класса I и класса II у всех этих видов идентична, но у разных видов произошла индивидуальная экспансия и экспрессия различных генов класса I.

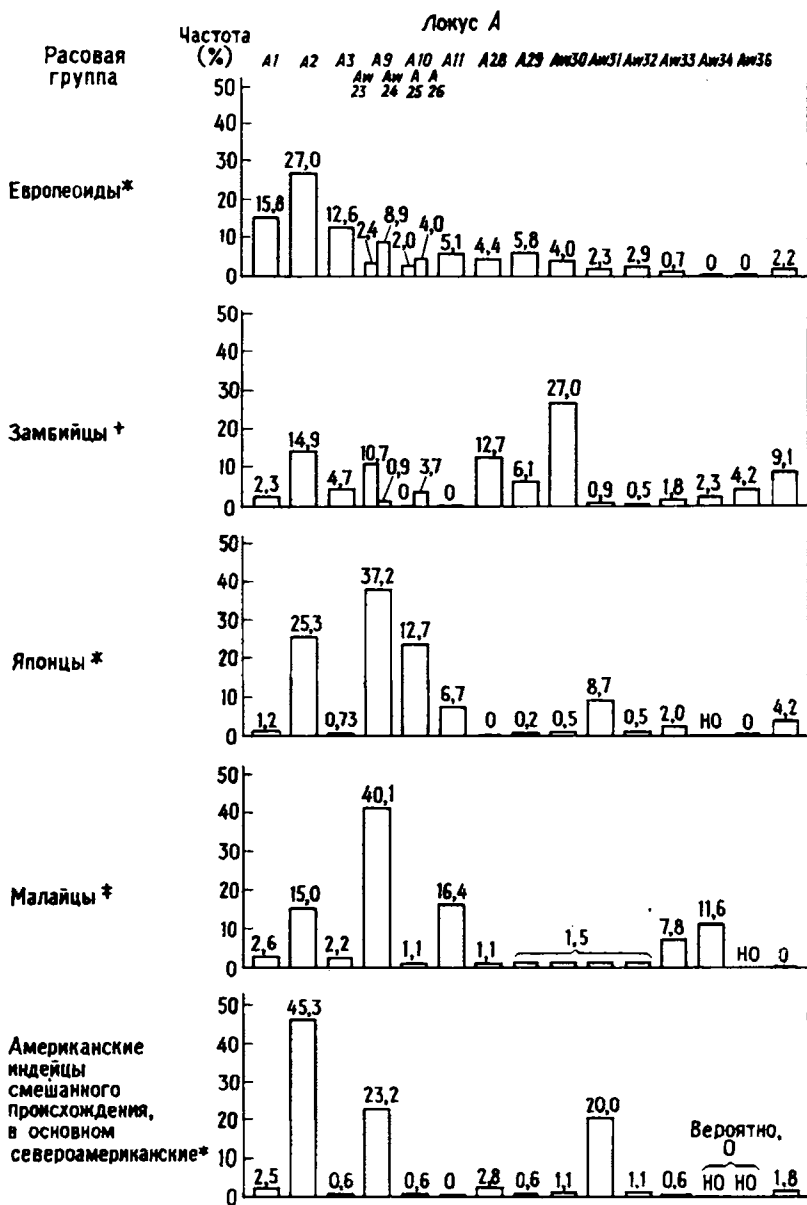
13.5.2.2. Серология

Серологические специфичности класса I у человека обозначают номерами, так же как и специфичности класса I у мыши. Многие номера отражают хронологический порядок, в котором специфичности «принимались» на рабочих совещаниях по гистосовместимости у человека. Они были приняты в результате компромиссного решения между представителями разных лабораторий, в которых эти специфичности уже независимо определяли на разных панелях сыво-роток и дали им свои рабочие обозначения. Может быть, именно по этой причине нумерация не была изменена, даже когда стало ясно, что специфичности можно разделить на две независимые серии, соответствующие локусам *HLA-A* и *HLA-B*. С другой стороны, после открытия локуса *HLA-C* было принято решение нумеровать специфичности этого локуса независимо, опять начиная с единицы. Последнее обстоятельство вносит, однако, несоответствие в систему цифровых обозначений для трех локусов класса I. Совокупность современных данных о серологии антигенов класса I человека представлена в табл. 13.18.

Таблица 13.18. Антигены HLA класса I¹⁾ (по [77, 78])

HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %
A1	18	B5	5	Cw1	3	Aw34		Bw35	8		
A2	32	B7	14	Cw2	5	Aw36		Bw38	1		
A3	15	B8	13	Cw3	19	Aw43		Bw39	2		
A9	9	B12	14	Cw4	9	Blank	1	Bw41	1		
A10	5	B13	2	Cw5				Bw42			
A11	6	B14	2	Cw6	18			Bw44	13		
A25	2	B15	10	Blank	46			Bw45	1		
A26	3	B17	4					Bw46			
A28	4	B18	4					Bw47			
A29	3	B27	5					Bw48			
Aw19	11	B37	1					Bw49			
Aw23	2	B40	10					Bw50			
Aw24	9	Bw4						Bw51			
Aw30		Bw6						Bw52			
Aw31		Bw16	3					Bw53			
Aw32	3	Bw21	2					Blank	1		
Aw33		Bw22	2								

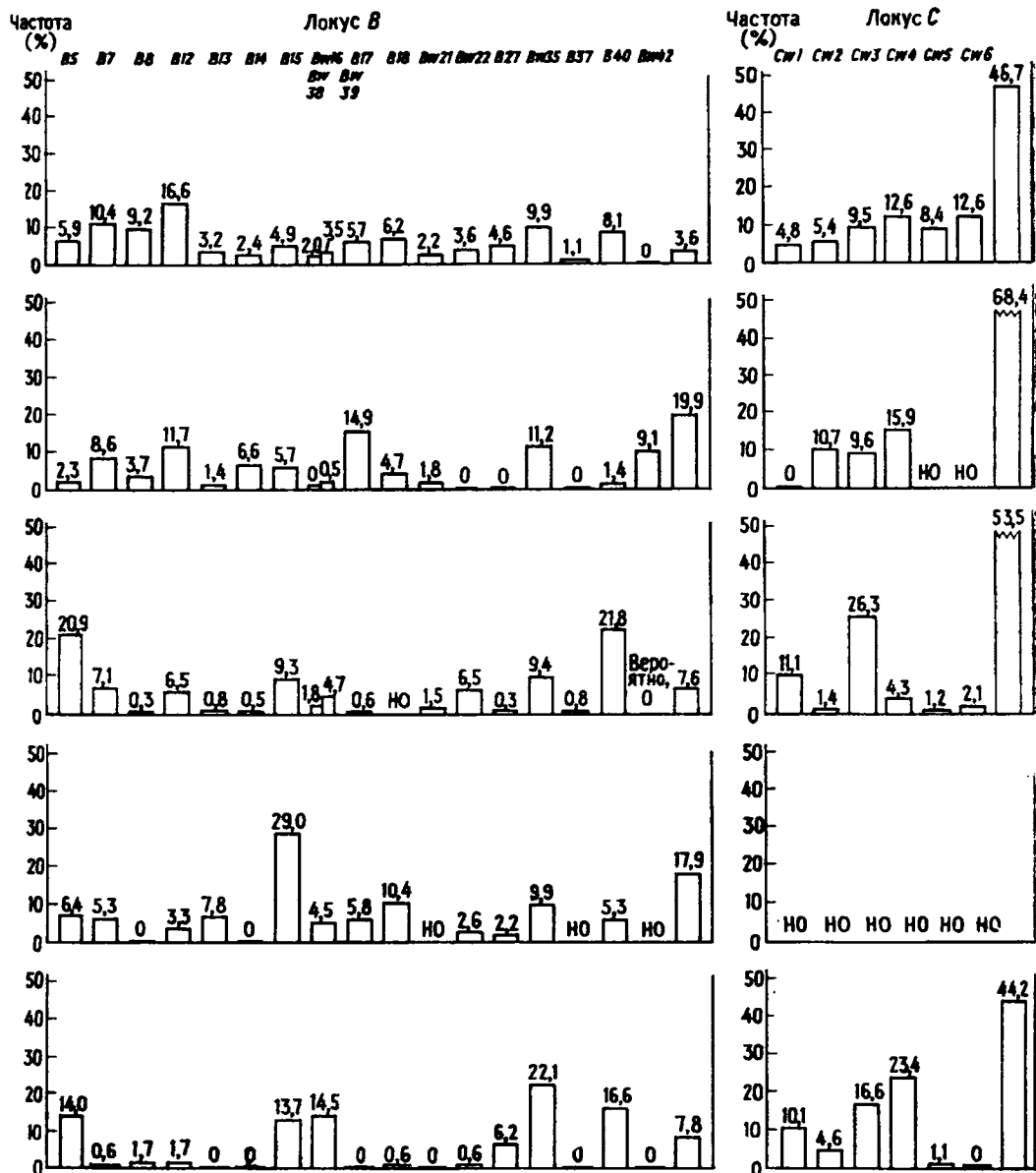
¹⁾ Приведенные величины представляют приближительные значения частот генов в одной датской популяции [77]. Буква «w» обозначает специфичность, принятую на рабочем совещании, но еще не утвержденную по правилам номенклатуры ВОЗ, за исключением антигенов локуса C, для которых буква w остается, чтобы не смешивать эти антигены с компонентами комплемента.



* Данные Рабочего совещания 1977г.

Рис. 13.16. Частоты распространения антигенов HLA в разных расовых группах. Частота фенотипа приблизительно вдвое пре-

вышает частоту гена. ([79]; печатается с разрешения.)



* Данные Рабочего совещания 1975г. * Данные Рабочего совещания 1972г. Ю-не определяли

В таблице указана также частота некоторых распространенных аллелей каждого из локусов в репрезентативной популяции европеоидной расы. Как можно заметить из таблицы, гаплотипы, в которых не определен аллель *HLA-C*, встречаются гораздо чаще, чем гаплотипы с неопределенными аллелями локусов *HLA-A* и *HLA-B*. Это, по-видимому, объясняется сравнительно слабой антигенностью продуктов локуса *C*, которая затрудняет получение соответствующих антисывороток; кроме того, бывает трудно отличить продукты локу-

са *C* от продуктов локуса *B*, с которыми он находится в тесном неравновесии по сцеплению (более подробно см. далее). Как отмечалось ранее, продукты локуса *H-2L* мыши были найдены лишь в случае двух гаплотипов; они обладают меньшим антигенным полиморфизмом, чем продукты локусов *H-2K* и *H-2D*. Можно представить себе, что локус *HLA-C* человека и локус *H-2L* мыши являются результатом сравнительно поздней экспансии генов *MHC* класса I у этих двух видов.

Частота некоторых аллельных вариантов антигенов *HLA* значительно различается у представителей разных рас (рис. 13.16). Различия могут отражать селективные преимущества определенных аллелей в конкретных условиях существования расовой группы; возможно также, что они отражают достижение независимых уровней генетического равновесия ввиду ограниченного контакта между группами. Вероятно, в каждой расовой группе существующие аллели достигают равновесного распределения, описанного законом Харди — Вайнберга (Hardy — Weinberg).

Ярким контрастом между серологическими специфичностями класса I человека и мыши является отсутствие общих специфичностей *HLA*, присущих более чем одному локусу. Так, все специфичности *HLA-A* находят только на продуктах локуса *A*, а серию специфичностей *HLA-B* — лишь на продуктах локуса *B*. Аналогичная ситуация могла бы иметь место, если бы при определении продуктов области *H-2* мыши мы оперировали исключительно частными специфичностями. Однако у мышей частные специфичности уникальны для каждого из гаплотипов, и трудно представить себе, чтобы одна и та же частная специфичность была широко распространена в аутбредной популяции.

Противоречивость ситуации с частными и общими специфичностями, вероятно, вытекает из разных подходов к определению серологических специфичностей у двух рассматриваемых видов. Определение специфичностей *HLA* включает в себя скрининг и отбор сывороток с наибольшим уровнем корреляций при тестировании панели. В результате для тестирования остаются лишь сыворотки, удобные для дискриминации разных аллелей. Таким образом, не учитываются сыворотки, реагирующие с общими специфичностями и поэтому имеющие «излишне» широкий спектр реактивности, неинформативный для анализа семей. Кроме того, специфичности *HLA*, определяемые конкретным набором хорошо коррелирующих между собой сывороток, могут быть очень сходны, но не обязательно идентичны. Поэтому не исключено, что определяемые детерминанты представляют собой нечто промежуточное между тем, что называют общей и частной специфичностью антигенов мыши. Они могут являться общими специфичностями, характерными для данного конкретного локуса. Результаты изучения структуры локусов указывают, что продукты локусов *A*, *B* и *C* так же сходны между собой, как и молекулы *H-2K*, *H-2D* и *H-2L* мыши. К тому же, когда были получены моноклональные антитела против антигенов *HLA*, оказалось, что они, как правило, реагируют с продуктами всех трех локусов. Вероятно, особенности серологии антигенов человека и мыши отражают не фундаментальные различия в природе серологических детерминант, а различие методологических подходов, использованных при получении соответствующих антител.

13.5.3. Локусы класса II

Определение и характеристика локусов класса II человека в настоящее время находятся в стадии бурного развития. Принято считать, что у человека область *HLA-D, DR*, расположенная на расстоянии 0,7 ед. карты левее *HLA-B*

(рис. 13.13), является аналогом мышинной области *H-2I*. Тем не менее число локусов в этой области служит предметом многочисленных исследований на серологическом, биохимическом и функциональном уровнях.

Все известные в настоящее время антигены класса II человека закодированы в области, расположенной ближе к центромере, чем *HLA-B* (т. е. по ту же сторону от *HLA-B*, что и ген *GLO*). Эту область часто в рабочем порядке называют областью *D*. Однако формальной договоренности о том, что считать точными границами данной области, пока еще нет, и, следовательно, этот термин неточен. Исторически первым фенотипическим проявлением, контролируемым генами *HLA*, лежащими слева от *HLA-B*, была способность индуцировать *in vitro* сильную реакцию смешанной культуры лимфоцитов. Возникло предположение, что это свойство обусловлено продуктом одного гена, получившего название *HLA-D*. Сегодня, однако, представляется, что фенотип *HLA-D* реализуется через кумулятивный эффект нескольких (более одного) генов, расположенных левее *HLA-B*. Определение фенотипа *HLA-D* донора проводится методом стимуляции тестируемых клеток гомозиготными типизирующими клетками (ГТК). Теоретическое обоснование теста заключается в том, что ГТК (их можно получить от лиц с генотипической гомозиготностью по *HLA*, являющейся следствием браков между кровными родственниками) не будут стимулировать тестируемые клетки лишь в том случае, если последние имеют такой же фенотип *HLA-D*, как и ГТК. С помощью этого метода было определено не менее 10 различных специфичностей.

Приблизительно в то же время, когда разворачивались серологические исследования антигенов Ia мыши, начали появляться работы по изучению серий антигенов человека, экспрессированных главным образом на В-клетках и макрофагах [96]. Эти антигены при картировании локализовались в том же самом (или тесно сцепленном) участке комплекса *HLA*, что и locus *HLA-D*. Поэтому locus, ответственный за серологические специфичности, получил название *HLA-DR* (*D-related*). Список известных специфичностей *HLA-DR* приведен в табл. 13.19. Хотя большинство исследователей, занимающихся иммуногенети-

Таблица 13.19. Антигены *HLA* класса II ¹⁾

<i>HLA-D</i> [80]		<i>HLA-DR</i> [81]		<i>SB</i> [82]		<i>MB</i> [83]		<i>MT</i> [83]	
Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %	Аллель	Частота, %
<i>Dw1</i>	7	<i>DR1</i>	7	<i>SB1</i>	6	<i>MB1</i>	35	<i>MT1</i>	35
<i>Dw2</i>	8	<i>DR2</i>	13	<i>SB2</i>	17	<i>MB2</i>	20	<i>MT2</i>	20
<i>Dw3</i>	8	<i>DR3</i>	11	<i>SB3</i>	8	<i>MB3</i>	38	<i>MT3</i>	28
<i>Dw4</i>	5	<i>DR4</i>	10	<i>SB4</i>	36	<i>Blank</i>	7	<i>Blank</i>	17
<i>Dw5</i>	6	<i>DR5</i>	10	<i>SB5</i>	2				
<i>Dw6</i>	10	<i>DRw6</i>	2	<i>Blank</i>	31				
<i>Dw7</i>	10	<i>DR7</i>	13						
<i>Dw8</i>	3	<i>DRw8</i>	3						
<i>Dw9</i>	1	<i>DRw9</i>	1						
<i>Dw10</i>	3	<i>DRw10</i>	1						
<i>Blank</i>	39	<i>Blank</i>	30						

¹⁾ Приведены приблизительные значения частот генов в европеоидных популяциях; ниже приведены ссылки на авторов, проводивших анализ каждой из перечисленных в таблице систем генов. Буква «w» обозначает специфичность, принятую на Рабочем совещании, но еще не утвержденную по правилам номенклатуры ВОЗ.

кой мыши, пришли к единому выводу, что стимуляция реакции СКЛ и экспрессия антигенов Ia являются свойствами одних и тех же продуктов области I, среди исследователей *HLA* до сих пор нет единого мнения по аналогичному вопросу. Сомнения объясняются главным образом случаями неполной корреляции между специфичностями *HLA-D* и *HLA-DR*, а также наличием в семьях рекомбинаций, отделяющих две аллельные серии. Однако оба этих противоречия можно объяснить недостаточной точностью определения аллелей каждого из локусов. Аналогичным образом специфичности *HLA-DR* могут представлять различные детерминанты, локализованные на молекулах, ответственных за стимуляцию СКЛ, но детерминанты *DR* могут отличаться в разных аллельных вариантах молекул *HLA-D* (следует учесть, что специфичности *DR* определяли главным образом путем анализа популяций, а не генотипирования в пределах семьи). Можно считать почти доказанным, что, как и в случае антигенов класса II мыши, специфичности *HLA-D* и *HLA-DR* локализованы на одних и тех же молекулах класса II.

Результаты наиболее поздних исследований доказывают существование по крайней мере трех различных молекул класса II, но не исключают наличия еще большего числа молекул. Одна из таких молекул, антиген SB (от англ. secondary B-cell — вторичный В-клеточный антиген) [84], определяемая в тесте пролиферации лимфоцитов при вторичном ответе, контролируется генетической областью, расположенной между центромерой и *HLA-DR* (согласно анализу рекомбинаций и селективному выпадению у мутантов). Эта молекула, для которой известны 5 аллельных вариантов (табл. 13.19), имеет много общего с *HLA-DR* по своей структуре и функции. С другой стороны, существует по крайней мере еще одна группа молекул, обозначаемых разными авторами как DC/MT/DS [85—87], которую пока не удалось четко отделить от *DR* путем рекомбинации. Показано, что эти молекулы иммунохимически отличны от *DR* и в отличие от *DR* имеют большее сходство с мышинными молекулами I-A, чем с молекулами I-E [88—90]. Следует ожидать, что исследования ближайших лет внесут ясность в наши представления о продуктах генов класса II человека.

13.5.4. Неравновесие по сцеплению

Поскольку рекомбинации, как известно, происходят между различными локусами комплекса *HLA*, следовало бы ожидать, что после достаточно длительного периода эволюции случайные акты рекомбинации приведут к равновесному распределению аллелей в каждом из локусов. При достижении равновесия частота любого конкретного аллеля в одном локусе не должна зависеть от аллелей в других сцепленных локусах. Другими словами, как показано в табл. 13.20, если частота гена *HLA-A1* в данной расовой группе равна 16%, а частота гена *HLA-B8*—9%, то можно было бы ожидать, что лица, у которых гены *HLA-1* и *HLA-8* расположены в одной хромосоме, составят 1,4% популяции. Однако во многих случаях результаты наблюдений опровергают этот прогноз. Наоборот, частота ассоциации определенных аллелей в различных локусах *HLA* нередко сильно превышает частоту, соответствующую равновесному распределению. Такое отличие от ожидаемой частоты ассоциации аллелей называют *неравновесием по сцеплению* и количественно оценивают параметром дельта (Δ). Часто используется понятие «относительная дельта» ($\Delta_{\text{отн}}$); эта величина несет больше информации, поскольку она учитывает частоту соответствующих антигенов в изучаемой популяции.

В различных расовых группах значительное неравновесие по сцеплению характерно для разных аллелей, но сам факт неравновесия по сцеплению уста-

Таблица 13.20. Неравновесие по сцеплению

Определение

Разница (Δ) между наблюдаемой частотой конкретного сочетания аллелей двух сцепленных локусов и частотой, ожидаемой при случайном характере сочетаний.

Расчет

Примем частоту аллеля a локуса 1 равной p

Примем частоту аллеля b локуса 2 равной q

Примем наблюдаемую частоту « ab » равной $F_{\text{набл.}}$

Тогда Δ (%) = $(F_{\text{набл.}} - pq) \times 100$

Пример

Аллель	<i>A1</i>	<i>B8</i>	<i>Dw3</i>
Частота, %	16	9	10
Ожидаемая	1,4 %	0,9 %	
Наблюдаемая	8,8 %	7,0 %	
Δ (%)	7,4	6,1	

новлен во всех изученных группах. В табл. 13.21 приведены некоторые достоверные значения Δ для ряда случаев неравновесия по сцеплению в европеоидных популяциях.

Таблица 13.21. Примеры неравновесного сцепления у европейцев (по [81, 91])

Гаплотип					Δ , %	$\Delta_{\text{отн.}}^1$ %)
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>DR</i>		
1	8				5,7	65
3	7				1,9	31
23	<i>w44</i>				1,8	24
29	<i>w44</i>				2,7	53
	<i>w44</i>	<i>w5</i>			4,0	58
	<i>w57</i>	<i>w6</i>			3,5	72
	<i>w35</i>	<i>w4</i>			8,4	83
	7		<i>w2</i>		1,5	
	7			<i>w2</i>	3,7	41
	8		<i>w3</i>		5,2	
	8			<i>w3</i>	6,2	65
	<i>w44</i>		<i>w7</i>		1,0	
	<i>w44</i>			<i>w7</i>	2,7	19

¹⁾ $\Delta_{\text{отн}}$ представляет величину Δ после внесения поправки на частоту конкретных антигенов в исследуемой популяции, т. е. она отражает частоту, с которой выявляется генетическое сцепление двух антигенов [81]. Так, величина $\Delta_{\text{отн}} = 100$ % указывала бы на то, что два антигена всегда обнаруживаются в сцепленном состоянии (в паре).

Чем объясняется существование неравновесия по сцеплению, неясно. Причина, возможно, кроется в том, что эволюционного времени оказалось недостаточно для достижения равновесного распределения. В пользу этой точки зрения говорит тот факт, что в пределах разных расовых групп в неравновесном сцеплении находятся не одинаковые, а разные аллели. С другой стороны, неравновесное сцепление может иметь функциональную основу. Иными словами, сочетание двух конкретных аллелей в разных локусах *HLA* может давать селективное преимущество. Последняя концепция привлекательна тем, что она объяс-

няет тесное сцепление локусов *MHC*, наблюдаемое у животных многочисленных видов. На самом деле, в эволюционном аспекте одним из лучших способов, позволяющих сохранять в потомстве оптимальное сочетание аллелей в двух полиморфных локусах, является тесное сцепление этих локусов.

Независимо от первопричин неравновесия по сцеплению его следует рассматривать как очень важное явление при анализе функции и генетики компонентов *MHC*. В частности, как будет показано далее, обнаружена ассоциативная связь различных заболеваний с определенными аллелями *HLA*. Как правило, такие ассоциации не абсолютны. Они указывают лишь на повышенный риск заболеваний при наличии конкретного аллеля. Несомненно, в пределах комплекса *MHC* существует гораздо больше генов, чем те, которые сегодня удастся типировать. Следовательно, вполне возможно, что связь с заболеванием отражает связь патологии не с аллелем данного локуса, а с аллелем какого-то другого, тесно сцепленного локуса, пребывающим в неравновесии по сцеплению с типлируемым аллелем. Важно также иметь в виду, что если существует какая-либо функциональная причина сильного неравновесия по сцеплению между аллелями двух локусов, то гены, расположенные между этими локусами, также должны быть подвержены действию такого неравновесия, т. е. частота рекомбинаций между ними будет значительно снижена. Хотя неравновесие по сцеплению не обнаружено у мыши, не исключено, что оно обуславливает зависимость значительных вариаций в частоте рекомбинаций в пределах *MHC* от анализируемого у гетерозиготы гаплотипа [2]. Во всяком случае, неравновесие по сцеплению является лишь понятием, необходимым при описании большой аутбредной популяции, подверженной случайным скрещиваниям.

13.5.5. Другие компоненты, сцепленные с *HLA*

Необходимым условием для изучения сцепления, а также для генетического картирования признака у членов одной семьи является полиморфизм конкретной структуры или функции в пределах вида. При использовании методов классического генетического картирования мономорфные гены (не имеющие аллельных вариантов) ведут себя как «молчащие» гены. Следовательно, в пределах комплекса *HLA* может быть локализовано множество пока еще не выявленных генов, детерминирующих важные функции. В случае уже известных генов наиболее убедительным доводом в пользу предположения, что сцепление с комплексом *HLA* имеет важное значение, является факт сцепления аналогичных в функциональном отношении генов с *MHC* у животных отдаленных видов. Можно полагать, что достаточно длительный период независимой эволюции в силу случайных причин отделил бы соответствующие локусы от *MHC*, если бы не было причин для сохранения сцепления.

Система комплемента млекопитающих состоит из ряда образующих каскад компонентов, во многом сходных с компонентами каскадной системы свертывания крови. Описано по крайней мере 10 различных компонентов комплемента человека, названных в хронологической последовательности C1, C2, C3, и т.д. Классическая активация системы комплемента происходит в результате связывания антигена антителами определенных классов, но комплемент может также активироваться по альтернативному пути, включающему сывороточные компоненты, известные под названием факторов пропердина. Система комплемента детально обсуждается в гл. 24.

Было показано, что в человеческой популяции некоторым компонентам комплемента человека присущ полиморфизм. Это сделало возможным проводить генетический анализ сцепления. В настоящее время установлено, что по край-

ней мере три таких компонента детерминированы генами, сцепленными с *HLA*. К ним относятся *C2*, *C4* и *Bf* (пропердиновый фактор *B*). Исходя из результатов картирования, можно предположить, что гены, кодирующие эти компоненты комплемента, расположены между локусами класса I и локусами класса II. То, что гены системы комплемента были найдены в пределах *MHC* как у человека, так и у мыши, с большой вероятностью свидетельствует о функциональной целесообразности такого сцепления. Однако конкретные причины сцепления, если они и существуют, до сих пор неизвестны.

Имеются данные о том, что детерминирование некоторых антигенов группы крови, так же как и контроль их экспрессии, осуществляется генами, сцепленными с *HLA*. Сюда относятся системы эритроцитарных антигенов *Chido*, *Rodgers* и *Bg*. Создается впечатление, что существование по крайней мере таких антигенов, как *Chido* и *Rodgers*, можно объяснить адсорбцией на эритроцитах компонентов комплемента, поскольку в сыворотке эти антигены обнаруживаются в больших количествах, чем на эритроцитах. Было показано, что два разных компонента *C4* (*C4F* и *C4S* — соответственно от англ. *fast* — быстрый и *slow* — медленный) детерминированы генами, сцепленными с *MHC*, и тесно коррелируют с антигенами групп крови *Chido* и *Rodgers*.

Среди прочих полиморфных систем, закодированных в пределах *MHC*, обнаружен вариант ферментного полиморфизма — недостаточность 21-гидроксилазы, а также серия Т-клеточных антигенов, экспрессированных на популяциях активированных Т-клеток [92, 93]. Постулируется, что последние антигены имеют сходство с системами антигенов *Qa* и *Tla* мыши, поскольку известен по крайней мере один случай, когда моноклональные антитела, использованные для выявления этих антигенов, преципитировали продукты, гомологичные антигенам класса I. Использование таких моноклональных антител поможет в ближайшем будущем выяснить природу этих продуктов.

13.5.6. Клиническое значение типирования *HLA*

13.5.6.1. Трансплантация

Клиническая трансплантация послужила первым и главным стимулом расширенного изучения системы *HLA*. В течение последних 15 лет клинические лаборатории, занимающиеся типированием, предоставляют огромное количество статистических данных, связанных с *HLA*, что дает возможность осуществить многие из иммуногенетических исследований *MHC*.

Нетрудно представить, как велико значение типирования *HLA* для стратегии клинической трансплантации между членами одной семьи (рис. 13.17). Вероятность несовместимости сибсов по множеству не-*HLA*-систем очевидна. Однако при подборе сибсов, идентичных по *HLA*, отторжение трансплантата почки наблюдается очень редко. Если начальный посттрансплантационный период длительностью в несколько месяцев проходит успешно, то в дальнейшем отторжение наблюдается лишь у небольшого процента реципиентов. Однако при трансплантации почки от несовместимого по *HLA* сибса прогноз гораздо менее благоприятен; он лишь немного лучше, чем в случае, если донор и реципиент вообще не являются родственниками (трансплантация от неродственного донора). Как и при трансплантации от неродственного донора, трансплантация от сибса, несовместимого по *HLA*, требует более жесткой иммунодепрессии; при этом эпизоды отторжения встречаются чаще, чем в паре *HLA*-идентичных сибсов. Единственная логическая интерпретация этих данных заключается в

том, что подбор совместимой по HLA пары донор-реципиент играет важнейшую роль в определении судьбы трансплантата.

Однако не у всех потенциальных реципиентов есть HLA-идентичные сибсы, которые могли бы служить донорами органов. Поэтому значительная часть клинических трансплантаций связана с использованием трупных органов, полученных от неродственных лиц в момент их смерти (например, смертельного поражения головного мозга в результате травмы). В последнее время среди клиницистов происходят бесконечные споры о том, влияет ли в такой ситуации типирование HLA на прогноз выживания трансплантата. В ряде обширных

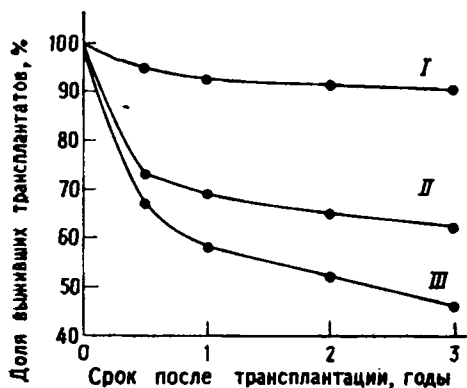


Рис. 13.17. Влияние совместимости по HLA на выживание трансплантата почки.

Опыт работы многочисленных медицинских центров показывает, что трансплантация почки между идентичными сибсами дает прекрасные результаты.

I — трансплантация между HLA-идентичными сибсами, II — трансплантация между родителями и детьми или между HLA-неидентичными сибсами, III — трансплантация трупной почки.

исследований было показано, что при сравнении результатов случайного подбора пар донор—реципиент с результатами, полученными при подборе пар по HLA, не наблюдается различий в длительности жизни трансплантированной почки. Наряду с этим, однако, имеются также данные о наличии, хотя и небольших, но статистически достоверных различий.

Такое расхождение в результатах опытов по трансплантации между сибсами и трансплантации от неродственных доноров объясняется, по-видимому, неодинаковым подбором совместимости по HLA в этих двух случаях. Как отмечалось ранее, при подборе сибсов методом типирования HLA в действительности происходит подбор не только по тем локусам, для которых есть типизирующие сыновотки, но и по всем тесно сцепленным с ними локусам. В то же время при подборе неродственных доноров, совместимых по HLA, можно с уверенностью говорить лишь о сходстве локусов, доступных для типирования. Поэтому даже после типирования по всем известным локусам *MHC* остается вероятность того, что существуют другие, дополнительные локусы *MHC*, по которым два индивидуума различаются. Если эти дополнительные локусы также влияют на выживание трансплантата и к тому же обладают полиморфизмом, то становится очевидной большая разница между возможностью прогнозировать судьбу трансплантата на основе данных типирования в случае доноров-родственников и неродственных доноров.

Следовало бы ожидать, что с повышением надежности методов типирования и получением новых реагентов, определяющих все большее число полиморфных локусов *MHC*, корреляция между подбором донора трупного материала по *MHC* и клиническим прогнозом результатов трансплантации улучшится. По-видимому, эта тенденция действительно имеет место, поскольку в ряде опубликованных в последнее время сообщений о трансплантации трупной почки отмечено, что типирование, включавшее подбор по антигенам DR, значительно улучшило корреляцию.

Трансплантация костного мозга представляет еще более трудную проблему. В этом случае даже несовместимость по слабым локусам гистосовместимости может быть достаточна для индукции РТПХ. Ввиду этого в большинстве медицинских центров трансплантацию костного мозга производят лишь в тех случаях, когда донором может быть *HLA*-идентичный сиблинг. Однако опубликовано небольшое число случаев успешной трансплантации костного мозга от неродственного донора, идентичного реципиенту по всем четырем типированным локусам *HLA* (*HLA-A, B, C, D, DR*). Все же, если принять во внимание чрезвычайный полиморфизм локусов *HLA* и их большое число, кажется нереальным на основе обычных методов подобрать полностью совместимую пару донор—реципиент. Поэтому многие исследователи считают, что попытки трансплантации костного мозга между неродственными лицами следует отложить до тех пор, пока не будут разработаны более эффективные методы специфической иммунотерапии.

13.5.6.2. Связь с заболеваниями

С точки зрения генетиков представляется привлекательной гипотеза о том, что существование полиморфизма в популяциях отражает определенные селективные преимущества разных аллелей в присутствии разных конкретных факторов отбора. Среди таких факторов рассматривали, в частности, опухоли, а также инфекционные и паразитарные заболевания. Поэтому неудивительно, что, когда был обнаружен широкий полиморфизм локуса *HLA*, генетики начали поиск взаимосвязи целого ряда заболеваний с аллелями этого локуса.

Попытки найти связь между предрасположенностью к заболеваниям и вариантами *HLA* получили новый стимул, когда стало известно, что гены *Ir*, контролирующие иммунный ответ на определенные антигены, сцеплены с *MHC* у многих видов млекопитающих. Можно представить себе целый ряд механизмов, с помощью которых гены *Ir* способны контролировать предрасположенность или устойчивость к заболеванию. Например, слишком слабая реакция на патоген, очевидно, приведет к ослабленной элиминации его и в конечном результате к развитию заболевания. Очень сильная реакция на антиген при некоторых обстоятельствах также может приносить вред, вызывая сильное воспаление в таких тканях, в которых этот процесс приводит к резкому нарушению их функций (например, клапаны сердца или ткань головного мозга). Избыточность иммунного ответа на чужеродный антиген может привести также к развитию аутоиммунной реакции, перекрестно направленной против какого-либо «своего» антигена.

Учитывая вышеизложенные соображения, генетики в течение последних 15 лет проанализировали множество заболеваний в поисках возможных связей с антигенами каждого из локусов *HLA*. Было выявлено много ассоциаций; некоторые из них представлены в табл. 13.22. Для описания уровня ассоциации между заболеванием и аллелем соответствующего локуса принят термин *относительный риск* (θ). Этот термин отражает соотношение между частотой заболевания в антиген-положительной и антиген-отрицательной популяциях. Пример вычисления относительного риска в случае связи между *HLA-B8* и синдромом Шёгрена приведен в табл. 13.23.

В целом, если относительный риск превышает единицу, это указывает на ассоциацию между заболеванием и конкретным антигеном, и чем больше величина относительного риска, тем эта ассоциация сильнее. Статистическая значимость относительного риска, как и во всех случаях статистических оценок, зависит от размеров группы больных и контрольной группы (здоровые лица) в конкретном исследовании. Кроме того, эта величина значительно варьирует в

Таблица 13.22. Некоторые достоверные ассоциации HLA с заболеваниями [94]

Заболевание	Связанный антиген HLA	Относительный риск
Врожденная аномалия развития сердца	A2	4,9
Идиопатический гемохроматоз	A3	9,3
Пузырчатка	A10	2,8
Болезнь Behçet	B5	7,4
Миастения гравис	B8	4,4
Системная красная волчанка	B8	2,1
Стеаторея	B8	8,9
Криптогенный фиброзирующий альвеолит	B12	9,4
Анкилозирующий спондилит	B27	90,1
Синдром Рейтера	B27	35,9
Инфекционный иерсиниозный артрит	B27	17,6
Ювенильный ревматоидный артрит	B27	4,5
Подострый тиреоидит	Bw35	16,8
Псориаз	Cw6	3,6
Стеаторея	Dw3 (DRw3)	73,0
Герпесный дерматит	Dw3 (DRw3)	13,5
Болезнь Аддисона	Dw3 (DRw3)	8,8
Ювенильный диабет	Dw3 (DRw3)	3,8
Ревматоидный артрит	Dw4 (DRw4)	3,9

зависимости от того, какое количество антигенов включено в анализ. Необходимо всегда производить поправку на число антигенов, поскольку статистическая оценка, как правило, подразумевает лишь один вопрос: отличается ли наблюдаемая частота ассоциаций от величины, теоретически ожидаемой при случай-

Таблица 13.23. Относительный риск

Определение

Отношение частоты выявления антигена в популяции больных к частоте выявления антигена в контрольной популяции.

Вычисление

$$O.R. = \theta = \frac{(Ag^{+}/Ag^{-})_{\text{больные}}}{(Ag^{+}/Ag^{-})_{\text{контроль}}}$$

		+	-	$\theta = AГ/БВ$
Заболевание	+	А	Б	
	-	В	Г	

Пример

		HLA-B8		$\theta = 6.1$
		+	-	
Синдром Шегрена	+	17	12	
	-	189	811	

ном сочетании факторов. В научных исследованиях принято считать, что если вероятность случайного появления наблюдаемой ассоциации составляет менее 5%, то наблюдаемая ассоциация действительно существует, т. е. является до-

стоверным фактом. Однако если всегда принимать 5%-ный уровень достоверности и анализировать достаточно большое число разных антигенов, то иногда можно чисто случайно найти «кажущуюся» ассоциацию между двумя независимыми факторами, т. е. получить кажущийся результат. В некоторых ранних работах по связи между HLA и заболеваниями этот фактор не учитывался. В результате появлялись сообщения о ложных, несуществующих ассоциациях. Позднее исследователи попытались вносить соответствующие поправки, уменьшая уровень вероятности, выше которого результаты считают достоверными, или проводя расширенные повторные исследования по поводу предполагаемых ассоциаций. Все ассоциации, приведенные в табл. 13.22, остаются высокодостоверными даже после внесения поправок. Кроме того, для некоторых из перечисленных в таблице заболеваний, имеющих семейный характер распространения, связь с HLA определяли путем типирования членов семьи. Таким путем можно было получить прямые данные о сцеплении.

Как видно из табл. 13.22, определенные ассоциации антигенов HLA с заболеваниями характеризуются невысокими величинами относительного риска, в других случаях относительный риск достаточно велик. В некоторых случаях ассоциации имеют настолько четкий и достоверный характер, что соответствующие антигены часто рассматривают как маркеры заболевания. В качестве примера можно привести связь между HLA-B27 и анкилозирующим спондилитом; в этом случае типирование по HLA нередко является частью дифференциальной диагностики заболевания. Многие клиницисты, участвующие в таких исследованиях, надеются, что установление ассоциаций между заболеваниями и антигенами HLA в конечном счете позволит выявлять группы высокого риска до появления клинических симптомов, с тем чтобы использовать превентивные терапевтические меры. Подразделенность популяции на основе типирования HLA, возможно, позволит также предсказывать, какие варианты терапии будут наиболее эффективны для конкретных групп больных.

Механизм ассоциации аллелей HLA с предрасположенностью к заболеваниям неясен и служит предметом многочисленных исследований. Вполне возможно, что в основе разных конкретных ассоциаций лежат разные причины. Как показано в табл. 13.22, некоторые наиболее яркие ассоциации включают в себя воспалительные заболевания, в патогенезе которых могут участвовать избыточные по интенсивности реакции иммунитета или аутоиммунные реакции; речь идет, например, о таких заболеваниях, как анкилозирующий спондилит, псориаз, герпесный дерматит, подострый тиреоидит и стеаторея. В таких случаях заманчиво предположить, что в основе иммунного компонента этих заболеваний лежит действие генов *Ir*.

Из табл. 13.22 видно также, что ассоциации с заболеваниями обнаружены для антигенов нескольких локусов HLA. Если механизм этих ассоциаций связан с генами *Ir*, может показаться странным, что ассоциации включают помимо области *D*, аналога области *I* мыши, антигены других регионов. Однако не следует думать, что все эти заболевания связаны с контролируемой «классическими» генами *Ir* презентацией антигенов молекулами класса II; возможно, что при некоторых заболеваниях нарушена эффекторная фаза, т. е. узнавание антигена в комплексе с молекулами класса I (см. табл. 13.5). Кроме того, неравновесное сцепление между аллелями разных локусов MHC также может оказывать сильное влияние на ассоциации. Например, в ранних работах относительный риск связи синдрома Шёгрена и HLA-B8 оценивался разными авторами как 1,4—5,9. По более поздним данным связь этого заболевания с HLA-Dw3 выражалась в уровне относительного риска от 6,9 до 19,2 [95]. Поскольку между HLA-B8 и HLA-D3 выявлено сильное неравновесие по сцеплению ($\Delta = 7,2\%$),

связь с В8 можно объяснить влиянием неравновесия по сцеплению на относительный риск. Неравновесием по сцеплению можно также объяснить неабсолютный характер большинства ассоциаций, т. е. тот факт, что заболевание развивается не у всех антиген-положительных лиц и, наоборот, что не все больные имеют соответствующий антиген. Если важную роль в ассоциации играет полиморфный ген *Ir*, пока еще не выявляемый при типировании HLA, и если этот гипотетический ген пребывает в неравновесии по сцеплению с геном одного из типизируемых антигенов, то относительный риск будет указывать на ассоциацию типизируемого антигена с заболеванием, а уровень относительного риска будет соразмерен степени неравновесия по сцеплению.

Заключение

Хотя *МНС* составляет лишь очень малую часть одной из хромосом, мы знаем о его генах и их продуктах больше, чем, наверное, о любом другом индивидуальном участке генома млекопитающих. Такая детальная информация была получена благодаря уникальным свойствам продуктов *МНС*, в особенности: а) их необычайному полиморфизму; б) важной функциональной роли и в) легкости их определения. В действительности наука знает мало областей, в которых возникали бы столь быстрые и очевидные связи между фундаментальными исследованиями и практическим клиническим применением.

Тем не менее, несмотря на достигнутый за последние два десятилетия огромный прогресс в наших знаниях о *МНС*, открытых вопросов все еще остается гораздо больше, чем решенных. В настоящее время большое внимание привлекает молекулярная биология генов *МНС*. Исследования в этой области обещают ответить на многие вопросы, связанные с эволюцией этих генов и механизмом их действия. Изучение генов иммунного ответа и *МНС*-рестрикции, возможно, прольет свет на биологическую функцию этих генов. Такие исследования, несомненно, откроют новые, крайне необходимые для клиники пути воздействия на иммунный ответ против антигенов *МНС*. Автор надеется, что фундаментальные иммуногенетические основы биологии *МНС*, рассмотренные в этой главе, помогут понять природу и значение нерешенных вопросов и позволят составить представление о некоторых инструментах, необходимых для дальнейшего научного поиска.

Благодарности

Авторы выражают признательность д-рам J. Stephen Shaw, Suzanne L. Epstein, Jeffrey A. Bluestone и William E. Paul за чтение рукописи и дельные предложения, а также Judith Jaworek за квалифицированную техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Green E. L., ed. Biology of the Laboratory Mouse, 2d Rev. Ed., Dover Publications, New York, 1975.
2. Shreffler D. C., David C. S. The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: Genetic variations, function, and organization, Adv. Immunol., 20, 125, 1975.
3. Klein J. Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex: Principles of Immunogenetics Applied to a Single System, Springer-Verlag, New York, 1975.
4. Sachs D. H. The Ia Antigens. In: Contemporary Topics in Molecular Immunology, ed. by H. N. Eisen and R. A. Reisfeld, pp. 1—33, Plenum, New York, 1976.

5. Foster H. L., Small J. D., Fox J. G., eds. The Mouse in Biomedical Research, Vol. 1. History, Genetics, and Wild Mice, Academic Press, New York, 1981.
6. Dorf M. E., ed. The Role of the major Histocompatibility Complex in Immunobiology, Garland STPM Press, New York, 1981.
7. Moller Goran ed. Biochemistry and Biology of Ia antigens, Transplant. Rev., 30, 3—322 (1976).
8. Gotze D., ed. The Major Histocompatibility System in Man and Animals, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
9. Amos D. B., Ward F. E. Immunogenetics of the HL-A system, Physiol. Rev., 55, 206—246 (1975).
10. Terasaki P. I., ed. Histocompatibility Testing 1980, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1980.
11. Svejgaard A., Hauge M., Jersild C., Platz P., Ryder L. P., Nielsen L. S., Thomsen M. The HLA System. An Introductory Survey, Monographs in Human Genetics, Vol. 7, S. Karger, Basel, 1979.
12. Little C. C., Tytzer E. E. Further studies on inheritance of susceptibility to a transplantable tumor of Japanese waltzing mice, J. Med. Res., 33, 393 (1916).
13. Medawar P. B. The immunology of transplantation. In: The Harvey Lectures 1956—1957, p. 144, Academic Press, New York, 1957.
14. Snell G. D., Stimpfling J. H. Genetics of tissue transplantation. In: Biology of the Laboratory Mouse, ed. by E. Green, p. 457, McGraw-Hill, New York, 1966.
15. Bailey D. W., Mobraaten L. E. Estimates of the number of loci contributing to the histoincompatibility between C57BL/6 and BALB/c strains of mice, Transplantation, 7, 394 (1969).
16. Graff R. J., Brown D. II. Estimates of histocompatibility differences between inbred mouse strains, Immunogenetics, 7, 367 (1978).
17. Gorer P. A. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera, Br. J. Exp. Pathol., 17, 42—50 (1936).
18. Kunz H. W., Gill T. J. Major histocompatibility complex of the rat, Surv. Immunol. Res., 1, 5 (1982).
19. Bach F. H., Widmer M. B., Bach M. L., Klein J. Serologically defined and lymphocyte-defined components of the major histocompatibility complex in the mouse, J. Exp. Med., 136, 1420—1444 (1972).
20. Klein J. The histocompatibility-2 (H-2) complex. In: The Mouse in Biomedical Research, Vol. 1, ed. by H. L. Foster, J. D. Small, and J. G. Fox, p. 119, Academic Press, New York, 1981.
21. Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: Sixth listing, Cancer Res., 36, 4333 (1976).
22. Klein J. List of congenic lines of mice, Transplantation, 15, 137 (1973).
23. Stimpfling J. H., Reichert A. E. Strain C57BL/10ScSn and its congenic resistant sublines, Transplant. Proc., 2, 39 (1970).
24. Murphy D. B., Herzenberg L. A., Okumura K., Herzenberg L. A., McDevitt H. O. A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface determinants on suppressor T lymphocytes, J. Exp. Med., 144, 699 (1976).
25. Hansen T. H., Sachs D. H. Isolation and antigenic characterization of the product of a third polymorphic H-2 locus, H-2L, J. Immunol., 121, 1469—1472 (1978).
26. Gorer P. A., Mikulska Z. B. Some further data on the H-2 system of antigens, Proc. R. Soc. Lond. [Biol.], 151, 57—69 (1959).
27. Lemke H., Hämmerling G. L., Hämmerling U. Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the Qa/TL region in mice, Immunol. Rev., 47, 175 (1979).
28. Ozato K., Mayer N., Sachs D. H. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens, J. Immunol., 124, 533 (1980).
29. Shreffler D. C., David C. S., Passmore H. C., Klein J. Genetic organization and evolution of the mouse H-2 region: A duplication model, Transplant. Proc., 3, 176—179 (1971).
30. Klein J. Cytological identification of the chromosome carrying the IXth linkage group (including H-2) in the house mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 1594—1597 (1971).
31. Klein J., Shreffler D. C. Evidence supporting a two-gene model for the H-2 histocompatibility system of the mouse, J. Exp. Med., 135, 924—937 (1972).
32. Hansen T. H., Ozato K., Melino M. R., Coligan J. E., Kindt T. J., Jandinski J. J., Sachs D. H. Immunochemical evidence in two haplotypes for at least three D region-encoded molecules, D, L, and R, J. Immunol., 126, 1743—1746 (1981).
33. Steinmetz M., Winoto A., Minard K., Hood L. Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens, Cell, 28, 489 (1982).

34. Gates F. T., III, Coligan J. E., Kindt T. J. Complete amino acid sequence of murine β_2 -microglobulin: Structural evidence for strain-related polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 554 (1981).
35. Lemke H., Hämmerling G. J. Topographic arrangement of H-2 determinants defined by monoclonal hybridoma antibodies. In: *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, ed. by G. J. Hämmerling, U. Hämmerling, and J. F. Kearney, p. 102, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981.
36. Singer D. H., Camerini-Otero R. D., Satz M. L., Osborne B., Sachs D., Rudikoff S. Characterization of a procine genomic clone encoding a major histocompatibility antigen: expression in mouse L cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1403 (1982).
37. Goodenow R. S., McMillan M., Orn A., Nicholson M., Davidson N., Frelinger J. A., Hood L. Identification of a BALB/c H-2Ld gene by DNA-mediated gene transfer, *Science*, **215**, 677 (1982).
38. Barbosa J. A., Kamarck M. E., Biro P. A., Weissman S. M., Ruddle F. H. Identification of human genomic clones coding the major histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7 by DNA-mediated gene transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6327 (1982).
39. Nairn R., Yamaga K., Nathenson S. G. Biochemistry of the gene products from murine MHC mutants, *Annu. Rev. Genet.*, **14**, 241—277. (1980).
40. Kohn H. I., Klein J., Melvold R. W., Nathenson S. G., Pious D., Shreffler D. C. The first H-2 mutant workshop, *Immunogenetics*, **7**, 279—294 (1978).
41. Melief C. J. M., van der Meulen M. Y., Postma P. CML typing of serologically identical H-2 mutants. Distinction of 19 specificities on the cells of four mouse strains carrying z1 locus mutations and the strain of origin, *Immunogenetics*, **5**, 43 (1977).
42. Shreffler D., David C., Gotze D., Klein J., McDevitt H., Sachs D. Genetic nomenclature for new lymphocyte antigens controlled by the I region of the H-2 complex, *Immunogenetics*, **1**, 189 (1974).
43. Jones P. P., Murphy D. B., McDevitt H. O. Two-gene control of the expression of a murine Ia antigen, *J. Exp. Med.*, **148**, 925 (1978).
44. Cook R., Vitetta E. S., Uhr J. W., Capra J. D. Structural studies on the murine Ia allo-antigens. V. Evidence that the structural gene for I-E/C β polypeptide is encoded within the I-A subregion, *J. Exp. Med.*, **149**, 981 (1979).
45. Ozato K., Lunney J. K., El-Gamil M., Sachs D. H. Evidence for the absence of I-E/C antigen expression of the cell surface in mice of the H-2^b or H-2^s haplotypes, *J. Immunol.*, **125**, 940 (1980).
46. Lafuse W. P., McCormick J. F., David C. S. Serological and biochemical identification of hybrid Ia antigens, *J. Exp. Med.*, **151**, 925 (1980).
47. Sachs D. H., El-Gamil M., Arn J. S., Ozato K. Complementation between I region genes is revealed by a hybridoma anti-Ia antibody, *Transplantation*, **31**, 308—310 (1981).
48. Sharrow S. O., Mathieson B. J., Singer A. Cell surface appearance of unexpected host MHC determinants on thymocytes from radiation bone marrow chimeras, *J. Immunol.*, **126**, 1327—1335 (1981).
49. Klein J., Flaherty L., Vandeberg J. L., Shreffler D. C. H-2 haplotypes, genes, regions, and antigens: first listing, *Immunogenetics*, **6**, 489 (1978).
50. Mathis D. J., Benoist C., Williams V. E. II, Kanter M., McDevitt H. O. Several mechanisms can account for defective E α gene expression in different mouse haplotypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 273—277 (1983).
51. Lafuse W. P., McCormick J. F., Corser P. S., David C. S. Gene complementations to generate Ia antigens (Ia.23) on hybrid molecules, *Transplantation*, **30**, 341—346 (1980).
52. Lafuse W. P., McCormick J. F., Corser P. S., David C. S. Hybrid (combinatorial) Ia specificities: Gene complementations to generate Ia.22, *Immunogenetics*, **13**, 115—125 (1981).
53. Pierres M., Devaux C., Dosseto M., Marchetto S. Clonal analysis of B and T cell responses to Ia antigens, *Immunogenetics*, **14**, 481 (1982).
54. McMillan M., Cecka J. M., Murphy D. B., McDevitt H. O., Hood L. Partial amino acid sequences of murine Ia antigens of the I-EC δ subregion, *Immunogenetics*, **6**, 137 (1978).
55. McKenzie I. F. C., Morgan G. M., Sandrin M. S., Michaelides M. M., Melvold R. W., Kohn H. I. A new H-2 mutation in the I region in the mouse, *J. Exp. Med.*, **150**, 1323 (1979).
56. Hansen T. H., Melvold R. W., Arn J. S., Sachs D. H. Evidence for mutation in an I-A gene, *Nature*, **285**, 340—341 (1980).
57. McKenzie I. F. C., Morgan G. M., Melvold R. W., Kohn H. I. Serological and complementation studies in four C57BL/6 H-2 mutants, *Immunogenetics*, **3**, 241 (1976).
58. Hansen T. H., Walsh W. D., Ozato K., Arn J. S., Sachs D. H. Ia specificities on parental and hybrid cells of an I-A mutant mouse strain, *J. Immunol.*, **127**, 2228—2231 (1981).

59. McKean D. J., Melvold R. W., David C. Tryptic peptide comparison of Ia antigen and polypeptides from the I-A mutant B6.C-H-2^{bm12} and its congenic parental strain B6, Immunogenetics, 14, 41—51 (1981).
60. Lee D. R., Hansen T. H., Cullen S. E. Detection of an altered Ia β polypeptide in the murine Ir mutant B6.C-H-2^{bm12}, J. Immunol., 129, 245 (1982).
61. Lieberman R., Paul W. E., Humphrey W., Jr., Stimpfling J. H. H-2 linked immune response (Ir) genes. Independent loci for Ir-IgG and Ir-IgA genes, J. Exp. Med., 136, 1231 (1972).
62. Bazevanis C. N., Nagy Z. A., Klein J. A novel type of T-T cell interaction removes the requirement for I-B region in the H-2 complex, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3809 (1981).
63. Murphy D. B., Herzenberg L. A., Okumura K., Herzenberg L. A., McDevitt H. O. A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling surface determinants on suppressor T lymphocytes, J. Exp. Med., 144, 699—712 (1976).
64. Taniguchi M., Saito T., Takei I., Tokuhisa T. Presence of interchain disulfide bonds between two gene products that compose the secreted form of an antigen-specific suppressor factor, J. Exp. Med., 153, 1672 (1981).
65. Kanno M., Kobayashi S., Tokuhisa T., Takei I., Shinohara N., Taniguchi M. Monoclonal antibodies that recognize the product controlled by a gene in the I-J subregion of the mouse H-2 complex, J. Exp. Med., 154, 1290 (1981).
66. Waltenbaugh C. Regulation of immune responses by I-J gene products. I. Production and characterization of anti-I-J monoclonal antibodies, J. Exp. Med., 154, 1570 (1981).
67. David C. S., Frelinger J. A., Shreffler D. C. New lymphocyte antigens controlled by the Ir-IgG regions of the H-2 gene complex, Transplantation, 17, 122 (1974).
68. Sandrin M. S., McKenzie I. F. C. Production of a cytotoxic Ia.6-specific antibody, Immunogenetics, 14, 345—350 (1981).
69. Shreffler D. C., Owen S. D. A serologically detected variant in mouse serum: inheritance and association with the histocompatibility-2 locus, Genetics, 48, 9—25 (1963).
70. Passmore H. D., Shreffler D. C. A sex-limited serum protein variant in the mouse: Inheritance and association with the H-2 region, Biochem. Genet., 4, 351 (1970).
71. Boyse E. A., Old L. J. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics, Annu. Rev. Genet., 3, 269 (1969).
72. Flaherty L. The TLA region antigens. In: The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology, ed. by M. E. Dorf, pp. 33—58, Garland STPM Press, New York, 1981.
73. Boyse E. A., Old L. J., Stockert E. An approach to the mapping of antigens on the cell surface, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 886 (1968).
74. Vitetta E. S., Poulik M. D., Klein J., Uhr J. W. Beta 2-microglobulin is selectively associated with H-2 and TL alloantigens on murine lymphoid cells, J. Exp. Med., 144, 179 (1976).
75. Dausset J. Iso-leuco-anticorps, Acta Haematol., 20, 156 (1958).
76. Amos D. B., Ward F. E. Immunogenetics of the HLA system, Physiol. Rev., 55, 206 (1975).
77. Svejgaard A., Hauge M., Jersild C., Platz P., Ryder L. P., Nielsen L. S., Thomsen M. The HLA System. An Introductory Survey, S. Karger, Basel, 1979.
78. World Health Organization. Nomenclature for factors of the HLA system, Bull. WHO, 54, 461—465 (1978).
79. Joysey V. C., Wolf E. HAL-A, -B, and -C antigens, their serology and cross-reaction, Br. Med. Bull., 34, 217—222 (1978).
80. Dupont B., Braun D. W., Jr., Yunis E. J., Carpenter C. B. HLA-D by cellular typing. In: Histocompatibility Testing 1980, ed. by P. I. Terasaki, p. 229, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1980.
81. Baur M. P., Danilovs J. A. Population analysis of HLA-A, B, C, DR and other genetic markers. In: Histocompatibility Testing 1980, ed. by P. I. Terasaki, p. 955, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1980.
82. Shaw S., Duquesnoy R. J., Smith P. Population studies of the HLA-linked 5S antigens, Immunogenetics, 14, 153 (1981).
83. Duquesnoy R., Marrari M., Vietra J. Definition of MB and MT antigens by 8th international histocompatibility workshop B cell alloantiserum clusters. In: Histocompatibility Testing 1980, ed. by P. I. Terasaki, p. 861, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1980.
84. Shaw S., Demars R., Schlossman S. F., Smith P. L., Lampson L. A., Nadler L. M. Serologic identification of the human secondary B cell (SB) antigens: Correlations between function, genetics and structure, J. Exp. Med., 156, 731 (1982).

85. Tanigaki N., Tosi R., Pressman D., Ferrara G. B. Molecular identification of human Ia antigens coded for by a gene locus closely linked to HLA-DR, *Immunogenetics*, **10**, 151—167 (1980).
86. Duquesnoy R. J., Zeevi A., Marrari M., Halim K. Immunogenetic analysis of the HLA-D region. Serological and cellular detection of the MB system, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **23**, 254 (1982).
87. Park M. S., Terasaki P. I. Second DR locus. In: *Histocompatibility Testing 1980*, ed. by P. I. Terasaki, p. 578, UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1980.
88. Corte G., Calabi F., Domiani G., Bargellesi A., Tosi R., Sorrentino R. Human Ia molecules carrying DCI determinants differ in both alpha and beta subunits from Ia molecules carrying DR determinants, *Nature*, **292**, 537 (1981).
89. Shackelford D. A., Mann D. L., van Rood J. J., Ferrara G. B., Strominger J. L. Human B-cell alloantigens DCI, MTI, and BL12 are identical to each other but distinct from the HLA-DR antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4566—4570 (1981).
90. Goyert S. M., Silver J. Isolation of I-A subregion like molecules from subhuman primates and man, *Nature*, **294**, 266—268 (1981).
91. Bodmer W. F., Bodmer J. G. Evolution and function of the HLA system, *Br. Med. Bull.*, **34**, 309—316 (1978).
92. Gazit E., Terhorst C., Yunis E. J. The human «T» genetic region of the HLA lineage group is a polymorphism detected on lectinactivated lymphocytes, *Nature*, **284**, 275 (1980).
93. Cotner T., Mashimo H., Kung P. C., Goldstein G., Strominger J. S. Human T cell surface antigens bearing a structural relationship to HLA antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3858 (1981).
94. van Rood J. J., de Vries R. R., Bradley B. A. Genetics and biology of the HLA system. In: *The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology*, ed. by M. E. Dorf, p. 59—114, Garland STPM Press, New York, 1981.
95. Braun W. E. HLA and Disease: A Comprehensive Review, p. 43, CRC Press, Boca Raton, 1979.
96. Bodmer J. Ia serology. In: *Histocompatibility Testing 1977*, ed. by W. F. Bodmer et al., p. 35, Munksgaard, Copenhagen, 1978.
97. Robinson P. J., Graf L., Sege K. Two allelic forms of mouse β_2 -microglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1167, (1981).
98. Melchers I., Rajewsky K., Shreffler D. C. Ir-DLH_B: Map position and functional analysis, *Eur. J. Immunol.*, **3**, 754 (1973).
99. Lozner E. C., Sachs D. H., Shearer G. M. Genetic control of the immune response to staphylococcal nuclease. I. Ir-Nase: Control of the antibody response to nuclease by the Ir region of the mouse H-2 complex, *J. Exp. Med.*, **139**, 1204 (1974).
100. Fachet J., Ando I. Genetic control of contact sensitivity to oxazolone in inbred, H-2 congenic and intra-H-2 recombinant strains of mice, *Eur. J. Immunol.*, **7**, 223 (1977).
101. Hurme M., Chandler P. R., Heterington C. M., Simpson E. Cytotoxic T-cell responses to H-Y: Correlation with the rejection of syngeneic male skin grafts, *J. Exp. Med.*, **147**, 768 (1978).

Антигены главного комплекса гистосовместимости

Томас Дж. Киндт, Мэри Энн Робинсон

(*Thomas T. Kindt, Mary Ann Robinson*)

Появление данных о том, что генам главного комплекса гистосовместимости (генам *MHC*) принадлежит центральная роль в обеспечении иммунной функции, привело к интенсивному изучению этих генов и их продуктов [1—10]. Одним из важнейших аспектов этих исследований было определение тонкой структуры продуктов генов *MHC*. Выяснение структуры продуктов *MHC* поможет пролить свет на их функции и продвинуть вперед наши представления о молекулярных основах иммунологических процессов, определяемых данными продуктами. Дальнейшая цель этих исследований состоит в получении достаточной информации о первичной структуре продуктов *MHC* для осуществления прямого анализа генов *MHC* методами рекомбинантной ДНК.

Детальное изучение продуктов генов *MHC* человека и мыши удалось провести лишь в последние годы. Первоначальные сведения о том, что гены *MHC* кодируют гликопротеины, пополнились данными о полной аминокислотной последовательности ряда антигенов класса I. Методы с использованием рекомбинантных ДНК позволили более непосредственно изучать гены, кодирующие эти антигены, что дало возможность расшифровать последовательность геномной ДНК некоторых антигенов класса I человека и мыши. Хотя анализ структуры других антигенов *MHC* до сих пор несколько отстаёт от результатов изучения антигенов класса I, в отношении этих продуктов также получено много сведений благодаря применению методов сравнительного структурного анализа, таких, как получение пептидных карт и двумерный (2-М)-гельэлектрофорез. Первые сообщения о структурном анализе белков и ДНК антигенов класса II позволяют надеяться на быстрое развитие этой области исследований.

В настоящей главе основное внимание будет уделено исследованиям антигенов *MHC* классов I и II, кодируемых в локусах *H-2* мыши и *HLA* человека. Мы рассмотрим также основные методы, используемые при изучении структуры этих мембранных антигенов. Кроме того, будут представлены первые результаты анализа организации и структуры генов *MHC* методами рекомбинантной ДНК.

14.1. Продукты главного комплекса гистосовместимости

14.1.1. Реагенты и методы, используемые при выделении и обнаружении антигенов *MHC*

Серологические методы изучения антигенов *MHC* известны уже давно. Кроме того, используя антисыворотки против различных специфических белков *MHC*, можно усиливать или подавлять определенные функции иммунитета,

что дает возможность изучать функциональную роль различных специфичностей. Поскольку все эти методы дают возможность проводить анализ на микроаналитическом уровне, они не требуют выделения молекул антигена. Однако при попытках структурного анализа антигенов МНС возникают новые трудности, связанные с двумя особенностями этих антигенов.

Первая из них — это сравнительно низкое количество доступного для работы материала. Так, концентрация антигенов равна примерно $5 \cdot 10^5$ молекул на лимфоидную клетку (содержание антигенов на других клетках значительно ниже). Если принять, что выход выделяемого продукта составляет 20%, то для получения 5 мг молекул с мол. массой 50 000 потребуется 10^{12} клеток. Это соответствует примерно 1 кг клеток; для выращивания такого количества клеток потребовалось бы 500—1000 л культуральной жидкости. Между тем селезенка мыши содержит в среднем около 10^8 лимфоидных клеток.

Вторая трудность на пути изучения антигенов МНС состоит в следующем: эти антигены связаны с мембраной, и, следовательно, в них имеются гидрофобные участки. Из-за наличия в продуктах генов МНС гидрофобных участков с этими молекулами нельзя работать в буферных системах, обычно применяемых при выделении белков, поскольку в таких условиях молекулы агрегируют и становятся нерастворимыми.

Трудности, связанные с выделением антигенов МНС в количествах, достаточных для структурных исследований, были частично преодолены при изучении антигенов HLA-A и HLA-B человека. В этих опытах культивируемые *in vitro* линии клеток подвергали скринингу и отбирали линии, продуцирующие аномально высокие количества искомого антигена. Когда удалось получить такие линии от гомозиготных индивидуумов, появилась возможность, используя крупномасштабные методы культивирования, выращивать такие клетки в килограммовых количествах. Это позволило выделять антигены с помощью обычных биохимических методов и определить их первичную структуру обычным методом секвенирования пептидов. С помощью таких процедур Строминджер [9] полностью или почти полностью расшифровал первичную структуру антигенов HLA-A2 и HLA-B7.

Помимо крупномасштабного выращивания клеток используют также методы, основанные на введении радиоактивной метки в антигены МНС. Например, белки клеточной поверхности можно метить радиоактивным иодом по методу, при котором метка присоединяется к остаткам тирозина на определенных молекулах. Белки можно также пометить, выращивая клетки в культуральной среде, содержащей ^3H -, ^{14}C - или ^{35}S -аминокислоты. Методический подход с применением радиоактивной метки имеет то преимущество, что для выделения искомым антигенов можно использовать иммунологические реагенты, не опасаясь проблем, связанных с загрязнением нерадиоактивными белками. Анализ подвергается только радиоактивный материал, поэтому немеченый белок не мешает и может даже быть полезен в качестве носителя радиоактивных молекул. Эта методология нашла широкое применение при изучении продуктов МНС; ее можно использовать также при сравнительном структурном анализе и в более полных структурных исследованиях. Использование радиоактивной метки позволило определить полную аминокислотную последовательность антигенов класса I мыши.

Существует целый ряд методов, позволяющих преодолевать трудности, связанные с нерастворимостью МНС-структур. На ранних этапах изучения антигенов класса I эта проблема была сведена к минимуму путем «срезания» антигенов с клеточной поверхности с помощью протеолитического фермента папаина. Под действием этого фермента гидрофобная часть молекулы остается

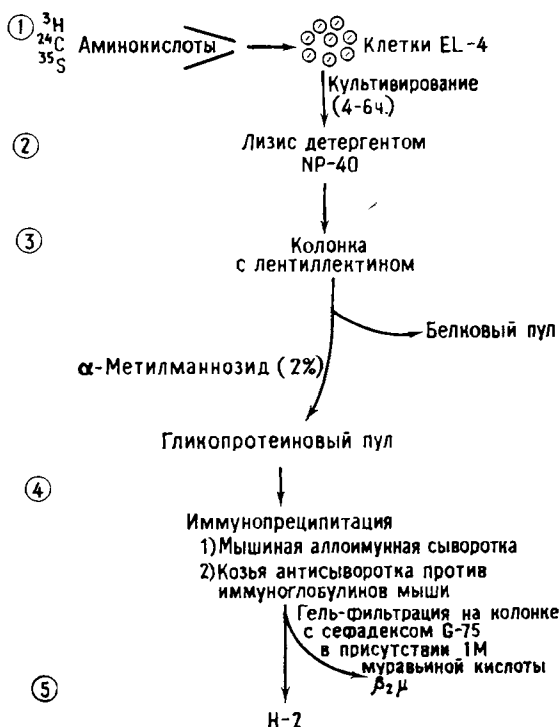


Рис. 14.1. Процедура выделения радиоактивно меченных молекул H-2.33 (Kb) для анализа аминокислотной последовательности.

В большинстве определений использовали аминокислоты, меченные тритием; для локализации перекрывающихся пептидов, полученных при ферментативном расщеплении, использовали ^{14}C -аминокислоты, при изучении дисульфидных мостиков молекулы — ^{35}S -Cys. ([6]; печатается с разрешения.)

погруженной в клеточную мембрану, а несущий антигены внеклеточный участок отщепляется и может быть выделен из надосадочной жидкости. Очевидно, что этот метод позволяет получать лишь неполные молекулы класса I без мембранного и цитоплазматического участков. Для получения антигенов класса II расщепление папаином неэффективно; обработка ферментом снимает с поверхности клетки лишь около 10% антигенов класса II.

Более общий методический подход к изучению нерастворимых антигенов включает в себя применение неионных детергентов, которые, солюбилизируя плазматическую мембрану, «освобождают» мембранные антигены. Особенно удобными оказались растворы детергентов, воздействующие только на плазматическую мембрану и не повреждающие ядерной мембраны. Антигены можно выделять из детергентсодержащих супернатантов с помощью обычных иммунологических методов, поскольку неионные детергенты не влияют на реакции антител.

На примере работы с солюбилизованными детергентом клетками, включившими метку в процессе роста в среде, содержащей радиоактивные аминокислоты, можно сформулировать общую схему выделения мембранных антигенов МНС. Применение этой схемы в случае выделения молекул H-2 мыши изображено на рис. 14.1. До применения иммунологических методов экстракты, полученные с помощью детергента, можно фракционировать на колонках с лектином и получить гликопротеиновые фракции. Выделенные антигены легко разделить на составляющие их цепи путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) или путем гель-фильтрации в диссоциирующем растворе.

Прогресс, наблюдаемый в области микросеквенирования белков и в методах разделения гель-электрофорезом, позволит в будущем работать с не мече-

ными антигенами МНС и исследовать пикомолярные количества антигенов. Это значительно облегчит процедуру анализа антигенов, особенно полученных из источников *in vivo*.

Другое новое направление, играющее важную роль в исследовании антигенов МНС, — это внедрение технологии гибридомных моноклональных антител. Как было подробно изложено в гл. 13, серологические реагенты для определения (и выделения) антигенов МНС мыши получают путем внутривидовой иммунизации мышей, конгенных по *H-2*. Некоторые из таких сывороток не обладают достаточной силой или специфичностью и поэтому не могут быть использованы для выделения антигенов. Было показано, что, используя вместо таких сывороток моноклональные антитела, можно осуществить ранее невыполнимое выделение антигенов. Такие антитела особенно удобны при изучении антигенов человека, поскольку в этом случае внутривидовая иммунизация — процедура не из обычных.

14.1.2. Основные структурные особенности антигенов класса I, II и III

Различия функций, определяемых антигенами класса I и II, как и распределение их на клетках и в тканях, изучены довольно хорошо. Функциональные различия отражаются в структурных различиях основных субъединиц

МНС H-2

Область	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>TL</u>
Субобласть		<u>A</u> <u>J</u> <u>E</u> <u>C</u>		<u>D, L</u>	<u>0a-1, 0a-2, 0a-3, Tla</u>
Продукт	■	▲	●	■	■

■ Антиген класса I: тяжелая цепь — гликопротеин 45 кДа
легкая цепь — белок 11,6 кДа, закодированный вне МНС

▲ Антиген класса II: α-цепь — гликопротеин ~ 35 кДа;
β-цепь — гликопротеин ~ 25 кДа

● Антиген класса III: C4 — молекула-предшественник дает начало субъединицам 100,75 и 35 кДа

Рис. 14.2. Схематическое изображение трех классов антигенов МНС мыши и кодирующих их генов. У человека к антигенам класса I относятся антигены HLA-A, B и C, а к антигенам класса II — антигены HLA-DR. ([6]; печатается с разрешения.)

антигенов класса I и II (рис. 14.2). Антигены класса III отличаются от антигенов класса I и II не только совершенно иной молекулярной массой и структурой полипептидных субъединиц, но и по распределению в организме: антигены класса III присутствуют в сыворотке, на мембране лимфоцитов их нет.

На рис. 14.2 схематически изображены комплекс *H-2* мыши и кодируемые в его пределах продукты. Антигены класса I, обозначенные K, D и L, называют также классическими трансплантационными антигенами, их аналогами у человека являются антигены HLA-A, B и C [11—15]. Дополнительные антигены класса I, кодируемые в тимус-лейкозной (TL) области, обнаруживаются лишь

на некоторых типах дифференцированных клеток иммунной системы [12, 16—20]. Этим они отличаются от К, D и L, распространенных повсеместно в клетках и тканях организма. В основе всех антигенов класса I лежит одинаковая структура: они состоят из двух цепей — гликопротеиновой цепи с мол. массой 44 000 и меньшей по размеру безуглеводной цепи с мол. массой 12 000, называемой также β_2 -микроглобулином (β_2m) [21]; у человека и мыши β_2m кодируется вне МНС.

Продукты класса II экспрессируются главным образом на В-лимфоцитах и макрофагах, кроме того, их находят еще и на некоторых активированных Т-клетках. Как отмечалось в гл. 13, область H-2I и ее аналог у человека HLA-D/DR контролируют способность иммунной системы реагировать на определенные антигены, а также восприимчивость к различным заболеваниям и патологическим состояниям. Продукты этих областей высокополиморфны; они состоят из двух нековалентно связанных цепей (обозначаемых *альфа* и *бета*) мембранных гликопротеинов. Молекулярная масса альфа- и бета-цепей составляет от 25 000 до 33 000 и от 24 000 до 29 000 соответственно. Существует также третья цепь с мол. массой около 31 000, называемая *инвариантной*, поскольку она, по-видимому, непалиморфна. Инвариантная цепь обнаруживается в комплексе с молекулами области I лишь при определенных способах выделения; не исключено, что эта цепь не входит в состав мембранной формы молекул класса II. Молекулярная масса альфа- и бета-цепей молекул области I мыши незначительно варьирует в зависимости от гаплотипа.

Между продуктами области МНС человека и мыши наблюдается соответствие; для большинства продуктов H-2 в системе HLA человека есть аналоги. Тем не менее у каждого из видов полный набор продуктов МНС обнаруживается не во всех гаплотипах. Например, гаплотип *d* кодирует антигены класса I К, D и L, а также недавно открытый антиген области D, получивший название R. В то же время среди продуктов гаплотипа *b* обнаружены лишь антигены К и D; для этого гаплотипа до сих пор не найдены аналоги L и R. Продукты HLA-C, по-видимому, отсутствуют у людей с определенным гаплотипом HLA. Так же обстоит дело с антигенами класса II, в случае которых некоторые продукты экспрессируются не во всех гаплотипах.

Третий класс антигенов, кодируемый в области S МНС, вначале получил название Ss (serum substance — компонент сыворотки). Хотя при тестировании гетерологичными антисыворотками Ss обнаруживался во всех мышинных сыворотках, содержание этого компонента варьировало как генетически детерминированный признак. В области S закодирована еще одна молекула класса III, концентрация которой зависит от концентрации тестостерона. Этот белок, названный Slp (sex-limited protein — белок, ограниченный полом), имеется только у самцов Slp-положительных линий мышей. Недавно было показано, что белки Ss и Slp идентичны по молекулярной массе и составу полипептидной цепи, однако различия в первичной структуре достаточно велики, чтобы считать эти белки продуктами разных локусов. Белки Ss и Slp имеют высокий уровень гомологии с компонентом C4 комплемента человека; вероятнее всего, эти белки представляют собой варианты четвертого компонента комплемента мыши [22, 23]. Компонент сыворотки (Ss) и Slp присутствуют в сыворотке в форме молекул с мол. массой 210 000, состоящих из трех субъединиц — 100 000, 75 000 и 35 000. Комплекс HLA человека кодирует компоненты комплемента C4 и C2 в области, аналогичной области S мыши.

Весь последующий текст настоящей главы будет посвящен детальному описанию структуры антигенов класса I и II. К антигенам класса III мы не будем возвращаться.

14.2. Антигены класса I [11—21]

Установить точно функциональную роль трансплантационных антигенов класса I до сих пор не удалось. Однако известно, что эти антигены участвуют в качестве основных мишеней в реакции отторжения аллотрансплантата и, кроме того, служат распознаваемыми структурами при взаимодействии между цитолитическими Т-клетками и инфицированными вирусом клетками-мишенями. Изучение первичной структуры молекул класса I должно в своем максимальном варианте показать, каким образом эти молекулы осуществляют перечисленные иммунные функции. Кроме того, исследование этих структур может способствовать решению многих частных проблем. Так, изучение антигенов МНС, являющихся мембранными белками, может принести новые сведения о мембранных белках в целом — важной группе белков, о структуре которых известно очень мало. Необходимо также выяснить следующие вопросы: 1) существуют ли закономерные и предсказуемые различия между продуктами локусов класса I и 2) каким образом чрезвычайно высокий антигенный полиморфизм находит отражение в вариациях первичной структуры продуктов разных аллелей. Более того, необходимо понять взаимосвязь между молекулами класса I и продуктами локусов, экспрессируемых лишь в клетках некоторых специализированных типов (антигены T_I и Q_a мыши и их аналоги). Сравнение продуктов МНС животных различных видов способно пролить свет на историю эволюции этих антигенов. Как будет видно из дальнейшего изложения, накоплена значительная информация о структуре антигенов класса I человека и мыши. Эти данные позволили по-новому понять некоторые вопросы, связанные с ролью антигенов класса I.

Начало исследований структуры трансплантационных антигенов относится к 60-м годам, когда Шимада и Натенсон [24] показали, что папаин способен отщеплять молекулы H-2 с поверхности клетки и что эти молекулы в растворимой форме можно выделить из клеточного супернатанта. Другой важной вехой в изучении антигенов класса I была работа Берггарда и Бёрна [26], обнаруживших неожиданно β_2 -микроглобулин в моче пациентов с дисфункцией почек. Позднее ученые пришли к выводу, что β_2m представляет собой малую субъединицу молекул H-2 и HLA. Осознание этого факта способствовало быстрому развитию исследований.

14.2.1. β_2 -Микроглобулин: субъединица молекул класса I [21]

Хотя β_2m является составной частью структур белков класса I у человека и мыши, кодирующие его гены расположены вне области МНС. В случае β_2m человека не выявлено генетического полиморфизма. С помощью методов гибридизации соматических клеток ген β_2m человека был локализован в хромосоме 15, а не в хромосоме 6, несущей гены МНС. Было показано, что белок β_2m мыши имеет генетически детерминированный диморфизм, обуславливающий замещение одной аминокислоты в положении 85; наличие диморфизма позволило картировать ген β_2m мыши. В результате этих исследований ген β_2m мыши был локализован в хромосоме 2, в то время как гены МНС мыши расположены в хромосоме 17.

К настоящему времени полностью установлена первичная структура некоторых антигенов класса I человека и мыши. Как уже отмечалось, методы определения структуры этих продуктов были разработаны лишь недавно, и по большей части они представляют собой отступление от классической методоло-

	10	20	30	40	50
β_2 -М мыши	I Q K T P Q I Q V Y S R H P P E N G K P N I L N C Y V T Q F H P P H I E I Q M L K N G K K I P K V E				
β_2 -М морской свинки	V L H A R V ————— A ————— Q — F I ————— S G ————— Q — V E L ————— D N —————				
β_2 -М кролика	V — R A — N V ————— A ————— F ————— S G ————— Q — D — E L ————— V — E N —————				
β_2 -М человека	— R — K ————— A ————— S — F ————— S G ————— S D — V D L ————— D — E R — E —————				
	60	70	80	90	99
β_2 -М мыши	M S D M S F S K D W S F Y I L A N T E F T P T E T D T Y A C R V K H ^A S M A E P K T V Y W D R D M				
β_2 -М морской свинки	— L ————— T — L — V — A A ————— N D S — E — S ————— S — I T L S — I — K — P N K				
β_2 -М кролика	Q — L — N ————— L — V ————— N N K N E — S ————— V T L K — M — K ————— Y				
β_2 -М человека	H — L ————— L — Y ————— K — E ————— N — V T L S Q — I — K —————				

Рис. 14.3. Первичная структура молекул β_2 m некоторых видов животных.

Прямые линии обозначают гомологию с последовательностью верхнего ряда (мышь). Для обозначения аминокислот использованы следующие сокращения: A — Ala, C — Cys, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M —

Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, Y — Tyr

В β_2 m мыши положение 85 у мышей линии C57BL/6 занимает Ala, у мышей линии BALB/c — Asp. ([21]; печатается с разрешения.)

гии. Тем не менее исследование первого из изученных структурных элементов молекулы HLA, β_2 -микроглобулина, было выполнено с помощью классических методов белковой химии.

β_2 -Микроглобулин человека был выделен из мочи пациентов с поражением почечных канальцев. Его мол. масса равна 11,6 кДа. Анализ аминокислотной последовательности показал, что молекула β_2 -микроглобулина состоит из 99 аминокислотных остатков и содержит два остатка цистеина, образующие дисульфидный мостик. Уже давно была обнаружена гомология между β_2 m и константными областями иммуноглобулинов, также имеющими дисульфидный мостик. Ниже мы рассмотрим эту гомологию более подробно.

Вначале полная аминокислотная последовательность была установлена для β_2 m человека; впоследствии была определена полная первичная структура β_2 m кролика, морской свинки и мыши. При сопоставлении первичных структур (рис. 14.3) выявляется большая степень гомологии (61—74%) между этими крайне консервативными белками. На малую изменчивость β_2 m в ходе эволюции указывают также наличие общих антигенных детерминант на молекулах β_2 m позвоночных разных видов и данные о способности β_2 m животных низших видов формировать *in vitro* комплексы с антигенами класса I человека.

Важнейшие вопросы, связанные с β_2 m, концентрируются вокруг его роли как малой субъединицы антигенов класса I. Некоторые сведения о значении этого белка были получены при изучении линии Дауди (клетки лимфомы Бэркитта человека), клетки которой не экспрессируют на поверхности антигены HLA-A, B и C. Оказалось, что в этих клетках дефект экспрессии связан с неспособностью продуцировать β_2 m. Если клетки разрушить детергентом, в лизате обнаруживаются тяжелые цепи молекул класса I, которые можно преципитировать соответствующими антителами. На основании этих данных сделан вывод, что β_2 m необходим для транспорта молекул класса I в аппарат Гольджи и далее к поверхности клетки. Данные биохимических исследований, связанных с выделением молекул β_2 m из пула молекул HLA, а также анализ реакций обмена

между молекулами β_2m на поверхности клетки и свободными молекулами β_2m в растворе свидетельствуют о том, что β_2m не связан ковалентно с тяжелой цепью и не закреплен в поверхностной мембране клетки. Получение моноклональных антител, одни из которых узнают антигены класса I в комплексе с β_2m , а другие реагируют лишь со свободными тяжелыми цепями, свидетельствует в пользу того, что в присутствии β_2m молекулы класса I претерпевают антигенные изменения.

14.2.2. Антигены HLA-A, B, C человека [11, 13—15]

Как уже было отмечено, *MHC* человека содержит три локуса, *A*, *B*, *C*, кодирующие главные трансплантационные антигены. По серологическим данным продукт локуса *A* имеет около 20 аллельных вариантов, продукты локуса *B* — 40 вариантов и локуса *C* — 8 вариантов. Первоначальные структурные исследования антигенов HLA принесли лишь ограниченную информацию о N-концевых участках этих молекул. Наиболее полные данные о первичной структуре были получены в результате двух различных подходов. Строминжер и др. [14] получили линию клеток от донора, гомозиготного по локусам *A* и *B*. Было показано, что эта линия клеток продуцирует молекулы класса I в очень высоких количествах. Клетки культивировали в условиях, обеспечивающих накопление большой биомассы. Затем из препаратов мембран биохимическими методами выделяли два антигена, A2 и B7. Трагард и др. [15] пошли по другому пути. Они брали трупные селезенки (независимо от *HLA*-гаплотипа доноров), выделяли из них пул антигенов класса I и использовали его для структурных исследований.

В табл. 14.1 приведена первичная структура внеклеточных участков HLA-A2, HLA-B7 и пула молекул класса I. Структура фрагмента B7, полученного в результате обработки клеток папаином, определена полностью; секвенирование трансмембранного участка почти завершено (см. табл. 14.2). Некоторые особенности этих структур заслуживают особого внимания. Прежде всего внеклеточные участки молекулы можно подразделить на три области, которые напоминают домены иммуноглобулинов и состоят приблизительно из 90 остатков каждая; эти области получили названия альфа 1, альфа 2 и альфа 3. Два домена, альфа 2 и альфа 3, содержат внутрицепочечные дисульфидные мостики, замыкающие петли длиной соответственно 63 и 86 аминокислотных остатков. В молекуле имеется один участок гликозилирования по остатку аспарагина в положении 86. Трансмембранный участок молекулы состоит из незаряженных и большей частью гидрофобных остатков; он прилегает к C-концу участка, отщепляемого папаином. Остальная часть молекулы, по-видимому, локализована на цитоплазматической стороне клеточной мембраны. Имеются данные о том, что некоторые остатки серина в этой части молекулы фосфорилированы.

В своей первоначальной работе по расшифровке последовательностей A2 и B7 Опп и соавторы [13] отметили, что участок, определяющий аллоантигенность, расположен, вероятно, между остатками 65 и 83. Анализ структур A2 и B7 показывает, что вариабельность ограничена немногими областями и тяжелые цепи обладают значительной гомологией на протяжении большинства отрезков. Наиболее яркий пример гомологии представляют участки между 194-м и 271-м остатками; последовательности этих участков идентичны для всех изученных антигенов, за исключением одной-единственной замены: молекула HLA-A2 в положении 253 вместо глутаминовой кислоты содержит глутамин. Тем не менее для выявления участков, определяющих аллоантигенность, потребуется еще множество сравнительных исследований структуры аллельных

Таблица 14.1. Сравнение аминокислотных последовательностей молекул HLA-B7, HLA-A2 и пула антигенов класса I человека ¹⁾ [14,15]

	10	20	30	40	50	60	70
HLA-B7	GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPFRFISVGVVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWDNRNTQIYKAQ.						
HLA-A2	-----F-----A-----Z--M-----KV---H						
Пул	-----Q---A-----N-----Q-----Q-----H						
	80	90	100	110	120	130	140
HLA-B7	AQTDRSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQSMYGCVDGPGDGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAA						
HLA-A2	-H-V--V-D-GT-----R-----S--W-F---YH-----K-----M---						
Пул	-----I-----						
	150	160	170	180	190	200	
HLA-B7	QITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRLRYLENGKDKLERADPPKTHVTNHPISDHEATLRCWALGFYP						
HLA-A2	---K-H-----V---L-----T-----QNRET-----T-----H---AV-----						
Пул	-----A-----R-----						
	220	230	240	250	260	270	
HLA-B7	AEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFEKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLT						
HLA-A2	-----Q-----						
Пул	-----N---N-----Q-----						

¹⁾ Расшифровка буквенных обозначений аминокислотных остатков приведена в подписи к рис. 14.3

продуктов. Большую помощь при решении этого вопроса окажут данные по изучению структуры антигенов мыши.

Структурный анализ пула антигенов класса I привел к несколько неожиданным результатам. По данным секвенирования в большинстве случаев, несмотря на гетерогенность пула, в каждом конкретном положении находится лишь по одной аминокислоте. За исключением 12 положений, аминокислотные остатки, выявляемые в максимальных количествах, были идентичны остаткам, определяемым в аналогичных положениях молекулы HLA-B7. Это наблюдение, возможно, отражает преобладание в изучаемой популяции некоторых (немногих) вариантов молекул A, B и C или, напротив, указывает на то, что вариации достаточно широко распределены по всей длине цепи, вследствие чего большинство антигенов в случайно подобранной выборке с большой вероятностью могут иметь идентичный аминокислотный остаток в любом конкретном положении. Предполагается, что если бы 10—20% молекул имели различия по одному и тому же положению в цепи, соответствующее положение было бы выявлено при секвенировании. Анализируя результаты секвенирования пула цепей, следует тем не менее учитывать некоторые технические детали. Например, для получения С-концевых участков полипептидных цепей авторы использовали метод кислотного отщепления, поэтому полипептиды, не содержавшие

Таблица 14.2. Полные аминокислотные последовательности Н-2К^в, Н-2Л^д и НLA-B7¹⁾

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Гомология
Н-2К ^в	GRHSLRYFVTAVSRPGLGERPRYMEVGYVDDTEFVRFDSDAENPRYERPRARWMEQEGREYWERETQKAKGNEQSFVLDLTLGLGYUNOSKG									с К ^в %
Н-2Л ^д	M.....E.....IS.....NK.....P.....Q.....W.....N.....A.....									85
HLA-B7	S---M---Y-S---R---FIS---Q---AS---E---P-I---D-N---IY-AQA---TD-ES---N-R-----EA									68
Н-2К ^в	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Н-2Л ^д	GSHTIQVISGCEVGSDBLLRGYDQYAYDGGDYIALNEDLKTWTAADMAALITKKHKEQAGEAERLRAYLEGTCVCEWLRRYLYKNGMATLLRT									
HLA-B7	T---L-WMY---D-----E-F-----F---SSQ-RR-----A---YY-----E-----H-----									79
Н-2К ^в	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Н-2Л ^д	L-SMY---D--P-----HD-----K-----RS-----T---Q---OR---A-R---OR-----E---KDK-E-A									71
HLA-B7	PIS-HEA-----E-----RD---DOT---T-----R-E---A---S-E---R-----Q-E---K-----									73
Н-2К ^в	DSPKANHVNHSRPEDKVTLRCSWALGFYRADITLTWQNLNGEELIQDMELVETRPAGDGTQKWSVVVPLQKEQYUTCNVVYHQGLPEPLTLRW									
Н-2Л ^д	P-SKGE-----T-----N-----R-----E-----									90
HLA-B7	28	29	30	31	32	33	34			
Н-2К ^в	ERPPSTVSNMATVAVLVVLGAIVTGAVVAFVVKMRNRNTGGKGGDYALAPGSQTSDSLSPDCKVMVNDPHSLA									
Н-2Л ^д	D-Y---YI-----G-----MALI-----()-----S-EM---R-----A									78
HLA-B7	...SSQSTVPVG VAV AV---VV-----A---C()---KSS-----S-Q---A C-DSAGG-DVSLT A									37

1) Сравнение аминокислотных последовательностей антигенов класса I мыши и человека. Последовательность Н-2К^в приведена из работы Колигэн и др. [2], последовательность Н-2Л^д составлена сочетанием данных по секвенированию белка и ДНК [34]. Последовательности расположены в соответствии с экзонами, выделенными при секвенировании ДНК. Последовательность HLA-B7 приведена из работы Опп и др. [13].

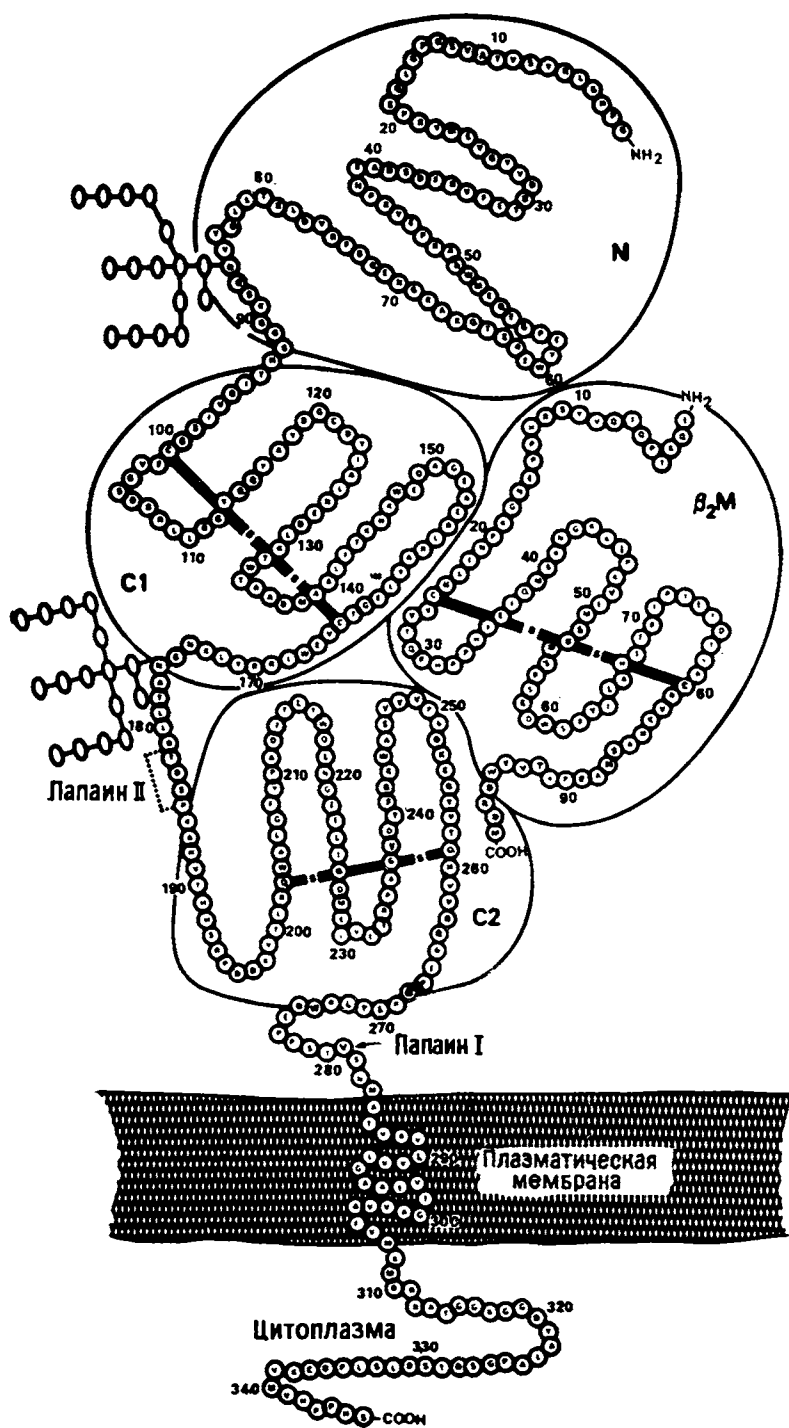
лабильную в кислой среде связь между аспарагиновой кислотой и пролином, выпадали из анализа последовательности С-концевого участка. Подобный нежелательный «отбор» полипептидных цепей может происходить при любом из используемых методов выделения.

14.2.3. Антигены класса I мыши [2, 6, 12]

Изучению структуры мышинных антигенов класса I в большой степени способствовала возможность получения аллоантисывороток против частных специфичностей этих антигенов. Наличие таких антисывороток давало возможность, вводя радиоактивную метку в линии клеток или в культивируемые клетки селезенки, получать из клеточных лизатов путем одно- или двухэтапной процедуры белковые молекулы определенной антигенной специфичности. Такие методы специфической иммунопреципитации использовались в ранних исследованиях, в которых сравнение различных антигенов класса I проводилось методом пептидных карт [76]. В этих работах впервые были выявлены большие структурные различия как между продуктами разных аллелей *H-2*, так и между продуктами разных сцепленных локусов. Эти наблюдения расширили представления о полиморфизме в данной системе, поскольку оказалось, что речь идет не только о наличии большого числа различных аллельных продуктов, но и о значительных структурных различиях между ними.

Антиген *H-2K^b*, определяемый антисывороткой *H-2.33*, стал первым антигеном класса I мыши, структура которого была полностью расшифрована. Хотя определение структуры было проведено радиохимическими методами, положение и выделение пептидов включало в себя стандартные технологические приемы химии белка. На рис. 14.4 представлены первичные структуры *K^b* и β_2m мыши. Отметим, что тяжелая цепь строится из трех доменов, расположенных на наружной стороне плазматической мембраны, и четвертого домена, проходящего сквозь цитоплазматическую мембрану и включающего в себя цитоплазматический участок значительных размеров.

Внеклеточные домены представляют собой три отрезка цепи одинаковой длины. Их последовательность можно сравнивать, зная расположение двух углеводных остатков в доменах N и C1. В доменах C1 и C2 имеются образованные дисульфидными мостиками петли, аналогичные петлям в цепях HLA. Наличие углеводного остатка в домене C1 является характерным отличием мышинной молекулы от молекул человека. Следует отметить, что некоторые цепи класса I у мыши имеют третий углеводный остаток; наличие не менее двух углеводных остатков присуще всем этим цепям. В пользу постулированного разделения цепей класса I на домены свидетельствует тот факт, что папаин расщепляет нативную молекулу в двух точках: в основном расщепление происходит на границе между C2 и трансмембранным участком молекулы; «минорная» точка расщепления расположена между доменами C1 и C2. Трансмембранная область образована гидрофобными остатками, она заканчивается последовательностью из пяти остатков, три из которых — остатки аргинина и один — лизина. Предполагают, что эта сильно заряженная последовательность служит для пространственной фиксации трансмембранного участка и предотвращает «скольжение» молекулы сквозь толщу клеточной мембраны. У других мембранных белков, таких, как гликофорин и цитохром *b₆*, гидрофобные последовательности также заканчиваются «щелочными» остатками. Остальная часть молекулы, вплоть до С-конца, состоит из сравнительно гидрофильной последовательности, которая, по-видимому, располагается на цитоплазматической (внутренней) стороне мембраны и может взаимодействовать с внутриклеточными компонентами.



14.2.3.1. Сравнение структур класса I мыши

К настоящему времени установлена полная первичная структура некоторых антигенов класса I мыши; кроме того, получено много данных о структуре целого ряда других белков этого класса. В одних случаях последовательности были определены в результате непосредственного анализа белков, в других — косвенным путем, по данным секвенирования соответствующих клонов ДНК.

В табл. 14.2, представлены первичные структуры молекул H-2K^b, H-2L^d и HLA-B7. Структура L^d была определена сразу двумя путями — в результате секвенирования белка и на основе секвенирования ДНК. Если сравнивать цепи по гомологии доменов, наибольшая степень идентичности как между двумя разными продуктами мыши, так и между белками мыши и человека характерна для третьего внеклеточного домена, а наименьшая степень гомологии — для трансмембранного участка. Заметим, что две мышинные цепи, изображенные в таблице, отличаются друг от друга по длине (на 9 остатков с С-конца); кроме того, цепь L^d имеет делецию остатка метионина в положении 309. При сравнении цепей HLA-B7 и H-2K^b выявляется 43% гомологии по остаткам, доступным для сравнения при сегодняшнем уровне знаний. Следует, однако, отметить, что полная («перекрывающаяся» неизвестные участки) последовательность этого участка в случае белков человека до сих пор не установлена. Любая ошибка в оценке длины молекулы может сильно повлиять на определение степени гомологии. За исключением С-концевого участка, общий характер выявляемых различий между цепями человека и мыши указывает на тесную гомологию между этими антигенами класса I. Различия по большей части рассредоточены по всей цепи, и различающиеся кластеры остатков сконцентрированы главным образом в N-концевой области.

В табл. 14.3 приведены N-концевые последовательности (каждая длиной 100 аминокислотных остатков) пяти различных полипептидных цепей H-2 класса I; цепи эти представляют собой продукты двух или трех локусов (K, D, L) двух различных гаплотипов (b и d). При сопоставлении этих последовательностей выявляются некоторые интересные особенности антигенов H-2. Прежде всего видно, что серологически выявляемые различия между продуктами генов отражают соответствующие различия в первичной структуре; обнаружение этого факта имело особенно важное значение в случае с молекулами L^d и D^d. Дело в том, что гены, кодирующие L и D, до настоящего времени не удавалось разделить рекомбинацией. Поэтому, только располагая данными о первичной структуре, можно было однозначно доказать, что соответствующие молекулы являются продуктами одного и того же гена.

При сопоставлении первичной структуры молекул, в табл. 14.3,

Рис. 14.4. Схематическое изображение аминокислотной последовательности молекулы H-2K^b и ассоциированной с ней молекулы $\beta_2\text{m}$.

Дисульфидные мостики Cys — Cys обозначены черными полосами. Молекула состоит из трех функциональных фрагментов: внеклеточный фрагмент (остатки 1-281), мембранный фрагмент (остатки 282-308) и цитоплазматический фрагмент (остатки 309-346). Внеклеточная часть молекулы подразделяется приблизительно на три субобласти; такое подразделение основано на гомологии угле-

водных групп, расположенных на расстоянии 90 остатков друг от друга в доменах N и C1, а также на наличии двух внутримолекулярных дисульфидных мостиков в C1 и C2. Предположение о глобулярной природе внеклеточных субрайонов основано на ограниченной чувствительности молекулы к папаину. При обработке папаином получают лишь два вида продуктов: интактный внеклеточный фрагмент молекулы и фрагмент, обозначенный как рар II, включающий домены N и C1. ([2]; печатается с разрешения.)

видно, что молекулы могут отличаться от «прототипной» (эталонной) молекулы K^b лишь по 13 остаткам (D^d) или в значительно большей степени (по 24 остаткам — K^d). Тот факт, что в данной ситуации наиболее отличной от молекулы K^b является ее аллельная форма K^d , не оставлял надежды на то, что в этой области полипептидной цепи можно выявить аминокислотные различия, которые могли бы служить маркерами конкретного локуса или области.

Таблица 14.3. Сравнение N-концевых последовательностей молекул класса I, принадлежащих гаплотипам $H-2^b$ и $H-2^d$ ¹⁾

	1	2	3	4	5
H-2K ^b	GPHSLRYFVTVASRPGLGEPYMEVGYYDDTEFVRFDSDAENPRYEPRAR				
H-2D ^b	----- M -----E-----E-----I-S-----N-K ----- P				
H-2K ^d	-----F-I-A ----- Q ----- D-A--F----- P				
H-2D ^d	--S-----F ----- N-----				
H-2L ^d	----- M -----E-----I-S -----N-K ----- P				
	6	7	8	9	10
H-2K ^b	WMEQEGPEYWERETQKAKGNEQSFRVDLRTLLGYYNQSKGGSHTIQVISG				
H-2D ^b	-----Q---W---S---N-----A-----L--QM---				
H-2K ^d	-----E-Q---R-V--S-D---W---S-T---A-QR-----F--RMF--				
H-2D ^d	--I-----R-R-----A--R-----A-----L--WMA--				
H-2L ^d	-----I---I---Q---W---N-----A---T---L--WMY--				

¹⁾ Последовательности $H-2K^b$, D^b , K^d , D^d приведены из работы Натенсона и др. [6]. Последовательность L^d была составлена на основании результатов секвенирования белка и ДНК [34].

Наиболее вариабельная область в последовательности из ста N-концевых остатков расположена между остатками 61 и 83; исходя из результатов сравнительного анализа HLA-B7 и HLA-A2, Строминжер [14] предположил, что эта область может быть участком, несущим аллоантигенную детерминанту. Этот вариабельный сегмент заканчивается высококонсервативной последовательностью, фланкирующей остаток Asn-86 (участок гликозилирования). В рассматриваемой последовательности из 100 остатков имеется одна наиболее вариабельная точка (положение 97), в этом положении у пяти молекул обнаружены четыре различные аминокислотные замены.

Различия между молекулами класса I более значительны, чем можно было бы ожидать для группы молекул, имеющих аналогичные функции и в ряде случаев представляющих продукты аллельных генов. Тем не менее сходство последовательностей достаточно велико, чтобы свидетельствовать об общем эволюционном происхождении соответствующих генов. Из 100 остатков 61 идентичен во всех молекулах, в еще 31 положении обнаружены лишь две аминокислотные замены в пяти положениях, причем в 19 положениях лишь один остаток из этих пяти отличается от остальных.

Помимо приведенных сведений, касающихся продуктов гаплотипов b и d , имеются разрозненные данные о N-концевых последовательностях продуктов

некоторых других гаплотипов. Среди молекул класса I областей *K* и *D* есть лишь одна молекула, о первичной структуре которой ничего не известно, это молекула H-2R, кодируемая в области *D* гаплотипов *d* и *q*. Данную молекулу определяли серологическими методами. Единственные данные о структуре H-2R были получены методом ДСН-ЭПГ (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН).

В дополнение к особенностям аминокислотной последовательности молекулы антигенов класса I мыши можно дифференцировать по другому структурному параметру. Речь идет о числе углеводных групп в молекуле. Молекулы K^b и D^d имеют по два, а молекулы D^b , L^d и K^d — по три участка гликозилирования. Углеводные группы связаны с остатками Asn в положениях 86 и 176; третий углеводный остаток в тех случаях, когда он есть, связан с положением 256. Отсутствие каких-либо особенностей в первичной структуре или характере гликозилирования у продуктов локусов *K* и *D* кажется удивительным; возможно, индивидуальные черты будут найдены в ходе дальнейшего структурного анализа, в особенности при изучении С-концевых фрагментов.

14.2.3.2. Другие молекулы класса I [12, 16—19, 23]

Помимо продуктов класса I, кодируемых в локусах *K*, *D*, *L* и *R* мыши и локусах *A*, *B* и *C* человека, существует другая группа антигенов, удовлетворяющих определению молекул класса I. У мыши есть группа генов, локализованных в хромосоме 17 теломерно по отношению к комплексу *H-2*; эти гены кодируют продукты класса I, обозначенные $Qa-1$, $Qa-2$ и *TL*. Как было показано, продукты этой области, получившей название *Tla*, сходны с продуктами класса I областей *K* и *D* в том отношении, что имеют такую же субъединичную структуру: β_2m и тяжелую цепь — гликопротеин с мол. массой около 45 000. Продукты области *Tla* имеют более ограниченное распределение по тканям, чем продукты генов областей *K* и *D*; функциональная роль этих продуктов не известна.

Данные о том, что молекулы класса I области *Tla* по субъединичному составу в принципе аналогичны молекулам области *K* и *D*, были единственными сведениями о структуре этих молекул, пока Солоски и др. [19] не получили антигены Qa в количествах, достаточных для проведения детального структурного анализа. Эти исследователи выделяли молекулы Qa из стимулированных митогенами клеток селезенки (клетки селезенки в состоянии покоя экспрессируют незначительные количества Qa , недостаточные для осуществления структурного анализа). Степень аналогии между молекулами $Qa-2$ и молекулами областей *K* и *D* определяли с помощью метода пептидных карт. Анализ показал, что молекула $Qa-2$ имеет сходство с молекулами *K* и *D* по 21—43% триптических пептидов, что указывает на приблизительно 75—90%-ную гомологию аминокислотных последовательностей. Исходя из данных о сходстве первичных структур молекул *K* и *D* и результатов сопоставления их пептидных карт, можно предположить, что молекулы $Qa-2$ и H-2K родственны друг другу в той же степени, что и молекулы H-2K и H-2D.

Дальнейшие исследования были направлены на определение N-концевой последовательности Qa ; в табл. 14.4 приведены сравнительные данные о N-концевых последовательностях $Qa-2$ и H-2K^b. Чтобы получить максимальную гомологию между двумя последовательностями, необходимо было допустить существование в молекуле H-2K^b вставки из двух аминокислотных остатков, расположенных со стороны С-конца от положения 3 (т.е. между положениями 3 и 4 молекулы H-2K^b). Введение такой вставки в схему позволило сравнить

последовательности по 18 остаткам; 14 из этих 18 остатков оказались идентичными для обеих молекул. Интересно отметить, что, в то время как во всех продуктах Н-2К и Н-2Д в положениях 6 и 21 находятся остатки аргинина, у Qa

Таблица 14.4. Гомология N-концевых последовательностей аллоантигенов Н-2К^b и Qa-2

	1										2										3										4												
	-2K ^b	G	P	H	[]	(13)	S	L	R	Y	F	V	T	A	V	S	R	P	G	L	G	E	P	R	Y	M	E	V	G	Y	V	D	D	T	E	F	V	R	F	D	S	D	A
Qa-2		H					L ¹	Y	F				V	R		L								1	F		V	L	Y	V					F		R	F					

¹⁾ Положения, в которых у всех известных антигенов класса I, за исключением Qa-2, находится Arg [19].

²⁾ Вставки, необходимые для максимального совмещения последовательностей Qa-2 и Н-2К^b.

в этих положениях находятся остатки других аминокислот. Эти данные указывают на то, что, несмотря на большое сходство цепей Qa с продуктами областей K и D, все же эти цепи могут иметь уникальные черты, характерные для продуктов генов этой группы.

14.2.3.3. Тимус-лейкозные антигены

Группа антигенов класса I, обозначаемая TL и кодируемая в локусе *Tla*, обнаруживается на клетках тимуса мышей некоторых линий и на лейкозных клетках при некоторых формах лейкоза у мышей всех линий. Шесть специфичностей антигена TL (TL.1 — TL.6) были определены с помощью обычных аллоиммунных сывороток.

Чтобы выяснить, связаны ли различные специфичности TL, с одной или несколькими разными молекулами, кодируемыми в *Tla*, был использован метод последовательных иммунопреципитаций. Согласно этому методу, экстракт обрабатывают антисывороткой или моноклональными антителами для истощения (устранения) конкретной специфичности; истощенный таким образом экстракт тестируют на наличие другой специфичности. Если после устранения первой специфичности вторая остается, она, очевидно, расположена на другой молекуле; наоборот, если вторая специфичность также исчезает, следует сделать вывод, что обе специфичности локализованы на одной и той же молекуле. Эксперименты такого рода показали, что детерминируемые в конкретном локусе специфичности TL находятся на одной молекуле, т.е. на антигенах TL можно выявить множественные эпитопы.

Тяжелую (45 кДа) цепь антигена TL выделили с помощью иммунопреципитации. Затем методом пептидных карт сравнивали ее с цепями антигенов Н-2К. При этом было показано, что родство антигена TL антигену Н-2К выражено слабее родства Н-2К другим антигенам гистосовместимости. Поэтому для антигена TL не была выявлена та сравнительно высокая степень гомологии с Н-2К, которая обнаружилась при сравнении антигенов Н-2К и Qa. Расчеты, основанные на количестве общих для TL и Н-2Д^d пептидов, указывают на приблизительно 21%-ный уровень пептидной гомологии. Следует, однако, предупредить читателя, что эта оценка получена при анализе лишь трех сходных пептидов из общего числа 25 пептидов обеих молекул и поэтому здесь возможна значительная ошибка. Несмотря на вероятную неточность оценки, можно все же сделать вывод, что антигены TL состоят в наиболее далеком родстве с другими продуктами класса I мыши.

14.2.4. Мутантные антигены мыши и человека [4]

Мутации антигенов класса I в ряде случаев выявились с помощью биологических тестов. Эти мутации оказались удобным инструментом для изучения конкретной взаимосвязи между функциями и различными продуктами локусов *МНС*. Используя мутации, можно определять тонкие корреляции между структурными различиями и наблюдаемыми функциональными изменениями. Антигены H-2 мыши — это наиболее тщательно изученная система мутантов, в особенности это касается области *K* гаплотипа *b*. Имеются также данные об антигенах HLA, не дифференцируемых серологическими методами, но проявляющих значительные различия в реакциях с цитотоксическими лимфоцитами. Структурный анализ молекул, селективированных по признаку функциональных особенностей, является одним из самых эффективных путей изучения взаимосвязи между структурой и функцией различных субрайонов молекул *МНС* класса I.

14.2.4.1. Мутанты H-2 мыши

Методика перекрестной трансплантации между родителями и потомством позволила выявить ряд мутантов, возникших в инбредных линиях мышей. 17 из 26 выявленных к настоящему времени спонтанных мутаций были картированы в гене *H-2K^b*. В результате было постулировано, что этот ген является самым мутабельным из известных генов млекопитающих. Определение полной первичной структуры молекулы *K^b* позволило детально исследовать мутантные продукты путем сравнительного структурного анализа.

В исследованиях, обеспечивших расшифровку структуры *K^b*, молекулу обрабатывали бромцианом (CNBr), под действием которого происходит расщепление пептидной цепи по остатку метионина со стороны С-конца. Бромциановые пептиды разделяли гель-фильтрацией и определяли их структуру путем секвенирования N-концевых последовательностей и дальнейшего расщепления на более мелкие пептиды с помощью протеолитических ферментов. При изучении структуры мутантов *K^b* Наирн и др. [5] получали бромциановые пептиды и сравнивали их с аналогичными пептидами «родительской» молекулы, используя карты триптических пептидов, полученные методом ионообменной хроматографии. Такая технология позволяет точно локализовать имеющиеся различия, не проводя дополнительной работы по определению полной последовательности каждой мутантной молекулы. Поскольку при картировании использовали триптические пептиды, в молекулу предварительно вводили радиоактивную метку по аргинину и лизину. Кроме того, в качестве метки использовали радиоактивный метионин, так как каждый бромциановый пептид должен после обработки трипсином оканчиваться метионином на С-конце. Зная характер распределения пептидов, получаемых при обработке «родительской» молекулы *H-2K^b*, можно было указать точную локализацию пептидов, отсутствующих или измененных в мутантной молекуле. Анализ такого рода были подвергнуты 10 различных мутантных молекул. Полученные результаты суммированы на рис. 14.5 и в табл. 14.5. Любой мутант отличается от «родительской» молекулы не более чем по двум аминокислотам; все мутации сосредоточены в N-концевой части молекулы. Некоторые мутанты имеют замены в одинаковых положениях. Анализ полученных результатов не свидетельствует в пользу сдвига рамки считывания или появления нонсенс-мутаций; большинство изменений, найденных у мутантов *H-2K^b*, ближе всего соответствуют категории точковых мутаций. Исключение составляет мутация *K^{bmi1}*, при которой каждая из двух аминокислотных замен обусловлена заменой двух оснований в соот-

ветствующих нуклеотидных триплетях. Все прочие известные замены аминокислот соответствуют единичным заменам нуклеотидных оснований.

Как уже отмечалось, перечисленные мутации были обнаружены в тесте отторжения трансплантата кожи. Помимо этого у ряда мутантных линий были

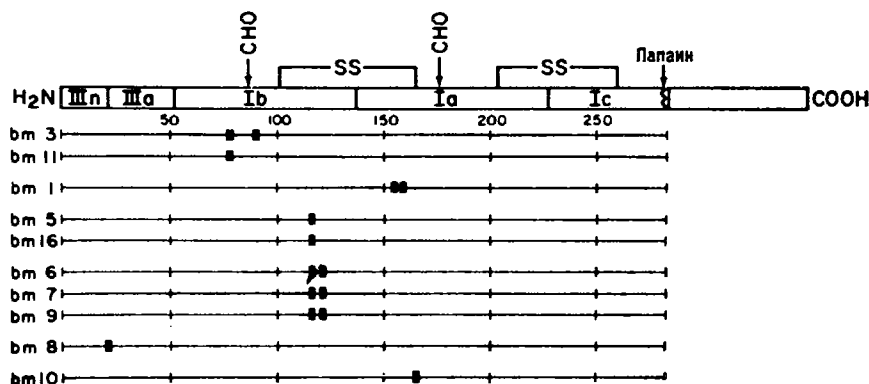


Рис. 14.5. Схематический план структуры молекулы H-2K^b, показывающий положения аминокислотных замен у мутантов по H-2K^b.

Номера положений, в которых произошла замена, указаны в табл. 14.5. ([5]; печатается с разрешения.)

найлены значительные различия в других иммунных функциях, осуществляемых антигенами класса I, например в способности антигенов функционировать в качестве мишеней для цитотоксических лимфоцитов. Хотя были получены моноклональные антитела, избирательно реагирующие с разными мутантами,

Таблица 14.5. Выявленные аминокислотные замены у мутантов H-2K^b (по [5])¹

Мутант	Бромция-новый пептид	Положение аминокислоты	Замена аминокислоты	Мутант	Бромция-новый пептид	Положение аминокислоты	Замена аминокислоты
bm1	Ia	155	Arg—Tyr	bm8	III n	121	Cys—Arg
		156	Leu—Tyr			23	Met—X
bm3	Ib	77	Asp—X	bm9	Ib	116	Tyr—Phe
		89	Lys—X			121	Cys—Arg
bm4	Ia	—	—	bm10	Ia	165	Val—Met
bm5	Ib	116	Tyr—Phe		Ia	—	—
bm6	Ib	116	Tyr—Phe	bm11	Ib	77	Asp—X
		121	Cys—Arg	bm16	Ib	166	Tyr—Phe
bm7	Ib	116	Tyr—Phe				

¹) Локализация замен схематически изображена на рис. 14.8.

следует подчеркнуть, что, как правило, мутантные варианты не удается дифференцировать стандартными серологическими реагентами, используемыми для типирования H-2. Таким образом, минимальные изменения первичной структуры, не выявляемые обычными серологическими методами, могут вызывать значительные изменения биологической активности молекул.

14.2.4.2. Функциональные варианты антигенов класса I у человека

Варианты антигенов класса I у человека, по-видимому аналогичные мутантным формам класса I у мыши, были выявлены в функциональном тесте, основанном на цитотоксической реакции против инфицированных вирусом клеток. В этом тесте путем стимуляции *in vitro* аутологичными клетками, инфицированными вирусом, получают цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ). Узнавание и лизис клеток-мишеней рестриктированы в такой системе двумя параметрами: используемой при иммунизации (примирующей) линией вируса и определенными антигенами HLA-A и HLA-B на клетках-респондерах. Иными словами, лизису будут подвержены лишь мишени, идентичные респондерам (ЦТЛ) по соответствующим антигенам HLA-A или HLA-B и инфицированные вирусом, использованным для примирования (т.е. тем же самым вирусом).

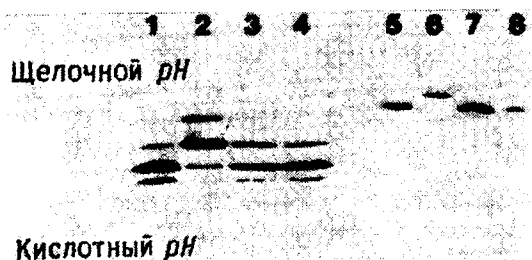


Рис. 14.6. Сравнительный анализ с помощью изоэлектрофокусирования вариантов молекул HLA-A2, определяемых по разной реакции цитолитических Т-лимфоцитов. Дорожки 1-4 соответствуют продуктам, полученным из клеточных линий JY, M7, S11

и UB17; дорожки 5-8 — тем же продуктам, но клетки выращивали в присутствии туникамина. В других работах показано, что ЦТЛ против HLA-A2 не лизируют клетки M7 (дорожки 2 и 6). ([11]; печатается с разрешения.)

Цитотоксические лимфоциты против вируса гриппа, рестриктированные по HLA-A2, лизировали все инфицированные этим вирусом мишени HLA-A2, за одним исключением [11]. Резистентные к действию ЦТЛ клетки несли аллель *HLA-A2*, продукт которого по всем серологическим критериям не отличался от антигена HLA-A2 клеток, чувствительных к действию ЦТЛ. Однако когда молекулы HLA-A2 трех «ЦТЛ-чувствительных» доноров сравнивали с молекулами «ЦТЛ-резистентного» донора методом изоэлектрофокусирования, было обнаружено четкое отличие молекул «резистентного» донора от аналогичных молекул «чувствительных» доноров (рис. 14.6). Дальнейший анализ показал, что различия зарядов этих молекул не связаны с различным содержанием сиаловых кислот, поскольку такие же различия наблюдались при изоэлектрофокусировании молекул, полученных из клеток, которые выращивали в присутствии туникамина (ингибитор гликозилирования). По предварительным данным рассматриваемый вариант молекулы HLA-A2 отличается от других молекул по определенному триптическому пептиду, содержащему единичную аминокислотную замену.

Детальные исследования рестриктированных по HLA цитолитических реакций выявили аналогичную гетерогенность молекулы HLA-A3. Некоторые варианты этой серии имели также различия, определяемые аллогенными ЦТЛ. Как и в случае варианта антигена A2, функциональные различия антигенов A3 не отражаются на их серологической реактивности.

Подробный анализ структуры мутантных антигенов класса I мыши и вариантов антигенов класса I человека принесет, по-видимому, много новой интересной информации. Возможность определять корреляции между минимальными изменениями первичной структуры и соответствующими функциональными изменениями, выявляемыми в различных тестах, представляет уникальную, не имеющую себе равных ситуацию для изучения структурно-функциональных взаимосвязей.

14.2.5. Взаимоотношения между антигенами класса I и иммуноглобулинами [14]

Еще на ранних этапах изучения структуры β_2m сразу несколько групп исследователей отметили бросающееся в глаза сходство между этой легкой цепью антигенов гистосовместимости и определенными молекулами иммуноглобулинов. В результате поиска гомологии β_2m с известными последовательностями пептидных цепей иммуноглобулинов было замечено, что β_2m имеет наибольшую гомологию с доменом CH_3 молекулы IgG. Хотя степень гомологии первичной структуры между β_2m и доменом константной области иммуноглобулина составляет лишь 28%, что само по себе не так уж много, существуют другие, гораздо более яркие черты сходства между этими молекулами. Было обнаружено, что из 11 положений, в которых домены константных областей всех иммуноглобулинов имеют идентичные аминокислотные остатки, β_2m идентичен иммуноглобулинам по 10 положениям. Более того, в идентичных положениях имеются такие редкие для молекул иммуноглобулинов аминокислотные остатки, как Cys, His и Trp. Расчеты, сделанные на основе всей известной в настоящее время информации о структуре иммуноглобулинов, показывают, что вероятность обнаружения в молекуле иммуноглобулина остатка Cys составляет 3/112, His — 2/112, в то время как аналогичная вероятность для остатка Ser равна 10/112.

Когда были получены данные о структуре тяжелой цепи антигенов класса I, оказалось, что между этими антигенами и иммуноглобулинами существует много общего. Прежде всего обе молекулы состоят из двух цепей, цепи в свою очередь построены из нескольких доменов, содержащих внутримолекулярные дисульфидные мостики. При дальнейшем анализе гомологии, проведенном на основе последних данных о последовательности антигенов класса I, были получены новые данные в пользу их родства с константными областями иммуноглобулинов и β_2m .

Наиболее полное исследование в плане поисков гомологии было проведено в отношении антигена HLA-B7 человека. Полная последовательность тяжелой цепи и последовательности ее фрагментов были сопоставлены со всеми известными белковыми последовательностями, отраженными в атласе Дейхоффа [77]. Самая высокая степень гомологии была обнаружена в участке, составляющем вторую дисульфидную петлю (третий внеклеточный домен): гомология с β_2m составляла 30%, а с шестью константными областями различных иммуноглобулинов — от 35% до 38%. Совпадения аминокислотных остатков имели особую значимость потому, что они включали нечасто встречающиеся аминокислоты Cys, His и Trp. Следует отметить, что для получения этой высокой степени гомологии оказалось необходимым допустить 7 делеций в молекуле β_2m (в сумме 10 остатков) и 3 делеции в домене CH_3 (5 остатков). В табл. 14.6 суммированы данные по гомологии между фрагментом HLA-B7, с одной стороны, и β_2m и других родственных белков — с другой.

Особенно выраженная гомология имеет место между триптическим декапептидом участка, составляющего вторую дисульфидную петлю HLA-B7, и некоторыми последовательностями константной области иммуноглобулинов. У этого пептида обнаружено 70% гомологии с пептидами, полученными из IgM человека, IgG₁ мыши и IgG₂ морской свинки. Хотя речь идет о сравнительно коротком пептиде, сходство усиливается тем обстоятельством, что гомология включает в себя совпадение по остаткам Cys и His.

Таблица 14.6. Гомология третьего внеклеточного домена HLA-B7 (остатки 184—272): гомология с β_2m и с отдельными участками иммуноглобулинов (по [9])

Совпадения с HLA-B7	Константная область					Варибельная область	
	β_2m ¹⁾	OU ²⁾ C _H 4	OA ³⁾ C _H 3	RBB IgG ⁴⁾	МОРС 21 ⁵⁾	BS-5 ⁶⁾	X ⁷⁾
Число совпадений	27/89	34/89	31/89	32/89	33/89	26/89	25/89
Идентичность, %	30	38	35	36	37	29	28
Число пропусков	9	12	12	10	13	15	13
Число остатков в пропусках	18	20	21	19	23	22	28
Редкие аминокислоты	2 Cys 2 His 1 Trp	2 Cys 1 His 1 Trp	2 Cys 1 His 1 Trp	2 Cys 1 His 2 Trp	2 Cys 1 His 1 Trp	2 Trp	1 Cys 2 Trp

1) β_2 -микроглобулин человека, положения 4—94.

2) IgM человека; положения 458—560 согласно нумерации белка OU.

3) IgM человека; положения 351—450 согласно нумерации белка OU.

4) IgG кролика; положения 345—446 согласно нумерации белка EU.

5) IgG₁ мыши; положения 345—446 согласно нумерации белка EU.

6) V_H и часть C_H1 кролика, положения 41—135.

7) V_L III и часть C человека; положения 30—129.

Наличие структурной гомологии между антигенами класса I и молекулами иммуноглобулинов в сочетании с тем очевидным фактом, что оба типа молекул непосредственно участвуют в иммунных функциях, свидетельствует в пользу общего эволюционного происхождения этих молекул. Хотя такое предположение, возможно, соответствует истине, следует все же проявлять осторожность при сравнении этих молекул. Известно, что антигены класса I отличаются большим разнообразием, но их гетерогенность не включает наличия гиперварибельных районов. Кроме того, не имеется никаких сведений в пользу выраженного соматического многообразия, которое было обнаружено в случае переменных областей иммуноглобулинов. В то время как в пуле иммуноглобулинов наблюдается значительная гетерогенность аминокислотных последовательностей V-области, мы не имеем никаких данных о микрогетерогенности антигенов класса I у мыши и человека. Далее, как уже отмечалось, дискретные различия между мутантными молекулами H-2K^b, сводящиеся к одной или двум аминокислотным заменам, оказывали сильное влияние на биологическую функцию этих молекул, что позволило выявлять мутантные варианты в биологических тестах. Следующее различие между иммуноглобулинами и антигенами класса I заключается в природе кодирующих генов. Хотя каждая молекула имеет характерную структуру доменов, отраженную в гаметных генах (т. е. генах первичных половых клеток), в отношении молекул класса I не обнаружено процессов дифференцировки, включающих в себя перегруппировку генов, подобную той, которая наблюдается в случае иммуноглобулиновых генов.

14.2.6. Гены, кодирующие антигены класса I [27—41]

Технология, основанная на использовании рекомбинантной ДНК, явилась новым могучим орудием при исследовании мультигенных семейств, таких, как *МНС*. Использование клонированных сегментов ДНК, кодирующих антигены *МНС*, позволит разрабатывать фундаментальные проблемы, неразрешимые в рамках серологической и структурно-биохимической методологии, такие, например, как определение числа генов *МНС*, особенности их организации и экспрессии. Кроме того, возможность реэкспрессии клонированных генов в новых клетках-хозяевах открывает перспективы функционального изучения индивидуальных *МНС*-продуктов на качественно новом уровне.

14.2.6.1. Подходы к изучению генов класса I

Первые работы по изучению генов класса I включали в себя выделение мРНК из клеток, образующих соответствующий антиген, и различные процедуры фракционирования РНК для получения обогащенной фракции, ответственной за синтез конкретных молекул класса I. Разделение контролировали, осуществляя трансляцию мРНК в системах бесклеточного синтеза белка и определяя искомый белок в смеси продуктов трансляции. Препарат, в достаточной степени обогащенный определенной мРНК, использовали для синтеза кДНК, которую встраивали в плазмиды и размножали в бактерии *Escherichia coli*. Имея библиотеку таких клонированных сегментов кДНК, можно затем проводить их скрининг по способности гибридизоваться с мРНК, ответственной за синтез антигена *МНС*. Скрининг может быть основан на ингибировании трансляции или на положительной селекции мРНК с помощью клонов кДНК. После выявления соответствующего клона встроенную ДНК «вырезают» из плазмиды и определяют ее последовательность. Последовательность ДНК в пределах такого сегмента должна соответствовать заранее известной белковой последовательности продукта.

Получение необходимого кДНК-зонда, основанное на использовании мРНК в синтетической системе, — утомительная, многостадийная работа, в ходе которой всегда существует опасность потерять высоколабильную мРНК. При этом возникают и дополнительные проблемы, включающие, например, получение соответствующих антител для преципитации синтетического продукта из системы бесклеточной трансляции. Как правило, аллоиммунные сыворотки не подходят для этой цели; наиболее удобными оказались гетероантисыворотки, которые могут реагировать со свободными цепями. Такие антисыворотки, однако, нередко реагируют с детерминантами, общими для нескольких антигенов. Поэтому остается неясным, какой антиген или антигены класса I будут содержаться в преципитате. Эти трудоемкие процессы можно обойти, если получить ДНК-зонд, способный к перекрестной гибридизации с искомым продуктом, или если использовать синтетический олигонуклеотид, соответствующий какому-либо фрагменту известной аминокислотной последовательности исследуемого антигена. Такой олигонуклеотид можно использовать как затравку для синтеза комплементарной ДНК в смеси молекул мРНК, в которой искомая мРНК содержится в минимальных количествах. Этот подход успешно использовали Суд и др. [39] для получения зонда кДНК молекул *HLA* класса I человека.

При получении клонированной кДНК антигена *H-2K^b* мыши Рейес и др. [37, 38] избрали другой путь, также основанный на использовании синтетического олигонуклеотида. Эти исследователи использовали последовательность остатков *H-2K^b* в положениях 51—56:

Trp	Met	Glu	Gln	Glu	Gly
TGG	ATG	GAA	CAA	GAA	GGX
		G	G	G	

Поскольку в этой последовательности для двух Glu и одного Gln в третьем положении кодона может быть одно из двух оснований, был синтезирован олигонуклеотидный зонд, содержащий смесь всех восьми возможных последовательностей. Синтезированный продукт включал последние два основания кодона Trp и первые два — кодона Gly. Кроме того, был синтезирован второй зонд из 11 нуклеотидов, основанный на последовательности аминокислотных остатков 58—61 молекулы K^b. На следующем этапе проводили скрининг библиотеки кДНК; для дальнейших исследований были выбраны клоны, гибридизовавшиеся с обоими олигонуклеотидными зондами. Таким путем был получен фрагмент ДНК, соответствующий последовательности аминокислотных остатков 50—91 молекулы H-2K^b.

14.2.6.2. Организация генов класса I

Использование зондов молекул класса I позволило выйти на новый уровень анализа генов класса I и их продуктов. Появилась возможность выяснить, например, следующие вопросы: сколько генов продуктов класса I содержится в индивидуальном геноме, как эти гены организованы, претерпевают ли гены *MHC* перестройки в процессе дифференцировки, могут ли гены *MHC* экспрессироваться в новых клетках-хозяевах и т.д.? Прежде чем обсуждать эти новые важные направления, рассмотрим соображения, связанные с новой информацией о структуре продуктов класса I, полученной благодаря работам по секвенированию ДНК.

Как отмечалось ранее, полная последовательность цепей известна лишь для некоторых антигенов класса I. Поэтому информация, полученная в результате секвенирования ДНК, значительно расширила наши знания в данной области. В особенности это касается тех случаев, когда частичное определение последовательности белка оказывалось достаточным как для выявления положительной корреляции с последовательностью гена, так и для установления полной структуры определяемого антигена на основе сочетания косвенных данных, минуя прямой анализ. Полное секвенирование гена H-2K^b мыши позволило внести ряд поправок в принятую последовательность белка — в том числе были добавлены два аминокислотных остатка на С-конце. При сравнении последовательностей белка и гена несоответствия были обнаружены лишь в двух положениях; не исключено, что эти несоответствия отражают реальные различия. Например, они могут быть следствием дивергенции по гену H-2K^b двух субштаммов лейкоза EL4, использованных авторами двух работ. К тому же, основываясь на данных о многочисленности генов класса I (см. далее в настоящей главе), следует учитывать следующую возможность: белок и клон кДНК вполне могут представлять собой два различных, хотя и близкородственных, репликата гена K^b.

На рис. 14.7 приведены известные к настоящему времени данные о белках класса I, полученные на основе секвенирования белков и нуклеиновых кислот. Одной из интересных находок в этой области является обнаружение последовательностей, специфичных для определенной генетической области. Исходное представление о том, что в этих структурах не выявляется «К-специфичность» или «D-специфичность», возникло из сравнения пептидных карт, где различия между продуктами разных локусов не превышали аллельные различия между продуктами одного и того же локуса. Это положение подтверждалось также

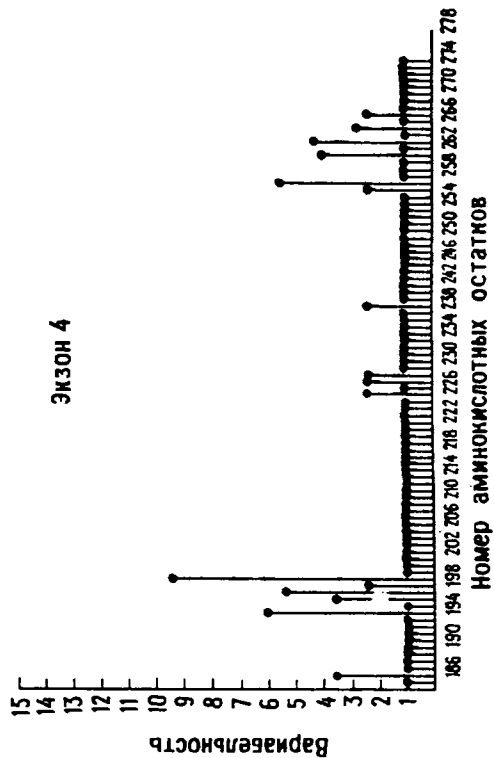
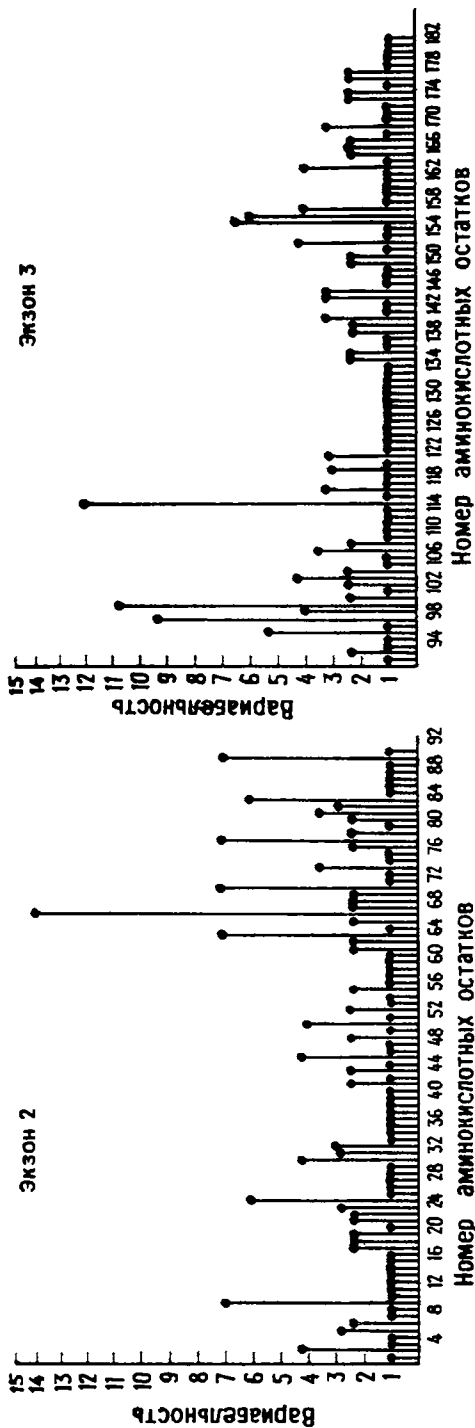


Рис. 14.8. Диаграмма вариабельности трех внеклеточных доменов молекул Н-2 класса I. Конкретные значения вариабельности были получены с помощью метода Ву и Кэбата [78] на основе данных, приведенных на рис. 14.7.

результатами определения N-концевых последовательностей, когда вновь не удалось найти черты, уникальные для продуктов К или D (см. табл. 14.3). Тем не менее анализ всех накопившихся к настоящему моменту данных показывает, что третий домен антигенов класса I мыши может иметь «маркерные» последовательности, характеризующие их как продукты разных областей (рис. 14.7). Новые данные сделали возможным проводить анализ вариаций антигенов класса I по методу оценки вариабельности V_H — Кэбата [78]. Диаграмма вариабельности трех внеклеточных доменов молекул класса I показывает, что наиболее консервативен третий домен. Вариации сконцентрированы на сравнительно малом числе участков, между которыми расположены протяженные крайне консервативные области (рис. 14.8).

14.2.6.3. Организация экзонов и интронов класса I

Как уже отмечалось, библиотеки кДНК создают путем обратной транскрипции с мРНК. Следовательно, клоны кДНК могут содержать информацию лишь об участках, кодирующих реально существующие белки, и представлять лишь

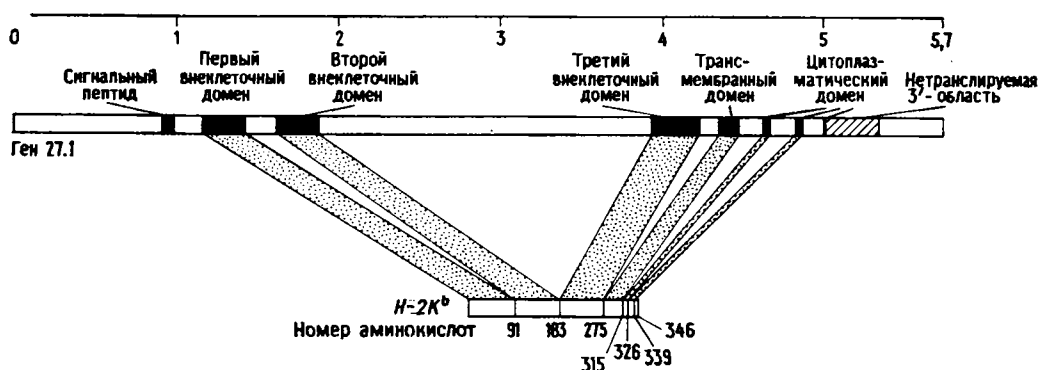


Рис. 14.9. Структура экзонов и интронов геномного клона, кодирующего молекулу H-2 класса I.

Последовательность гена сопоставляется с последовательностью белка H-2K^b. ([41]; печатается с разрешения.)

те гены, которые транскрибируются с последующим процессингом образующейся РНК. Существует, однако, и второй тип библиотек ДНК, полученных путем расщепления общей клеточной ДНК рестриктирующими ферментами и «упаковки» фрагментов ДНК в бактериофаг. Когда эти так называемые «геномные» библиотеки, полученные из различных клеточных линий и тканей мыши, подвергли скринингу, используя зонды ДНК генов класса I, появилась возможность локализовать и изучать гены *MHC* в той форме, в какой они реально существуют в геноме.

Был осуществлен полный анализ последовательности ДНК ряда геномных клонов класса I комплекса H-2. Оказалось, что, как и другие изученные гены, эти гены содержат кодирующие последовательности (экзоны), между которыми встроены некодирующие последовательности (интроны). Удивительная особенность геномной организации экзонов класса I состоит в том, что их организация почти непосредственно отражает подразделение на домены, выявляемое при анализе белковой структуры. На рис. 14.9 организация гена класса I сопоставляется с белковой структурой молекулы H-2K^b. Отметим, что первый экзон кодирует гидрофобную N-концевую «лидерную» последовательность.

Второй, третий и четвертый экзоны кодируют внеклеточные домены; размеры этих экзонов приблизительно совпадают с величинами, получаемыми при анализе распределения белка на домены на основе последовательности аминокислот. Четвертый экзон включает трансмембранный участок, а также С-концевой участок, содержащий много основных аминокислот. Цитоплазматическая часть молекулы кодируется несколькими небольшими экзонами; в этой области были установлены вариации в длине разных генов.

Гены *HLA* класса I человека имеют аналогичную организацию. Единственное различие заключается в том, что участок гена, кодирующий С-концевую цитоплазматическую часть молекулы, состоит лишь из двух экзонов и общая длина образующейся белковой молекулы на 10 аминокислотных остатков меньше, чем длина *H-2K^b* мыши.

14.2.6.4. Реэкспрессия генов класса I

Как уже отмечалось, трудно обнаружить корреляцию между последовательностями ДНК молекул класса I и серологически выявляемыми продуктами, если нет прямых данных о первичной структуре соответствующих белков. Существует, однако, экспериментальный подход, позволяющий обойти эту трудность, если создать специальный геномный клон. Такой клон, несущий ген класса I в сочетании с генетической информацией, позволяющей клетке выжить в условиях дефицита какого-либо метаболита (т.е. в селективной среде), встраивают в геном новой клетки-хозяина. Некоторые из трансформированных таким путем клеток экспрессируют не только продукт, необходимый для роста на селективной среде, но и продукт одновременно внесенного клонированного гена класса I. После этого трансформированные клетки можно типировать стандартными серологическими методами, проводить сравнительный структурный анализ нового продукта с известными белками и таким образом идентифицировать ген. Этот экспериментальный подход был успешно использован при анализе гена *H-2L^d*, экспрессию которого удалось осуществить в L-клетках.

14.2.6.5. Число генов класса I

С помощью метода, получившего название *блоттинг по Саузерну*, можно оценить число генов данного генома, гомологичных конкретному генному зонду. Метод заключается в том, что геномную ДНК расщепляют рестриктивными ферментами (рестриктазами) и разделяют фрагменты методом одномерного электрофореза. Затем производят блоттинг, т.е. перенос фрагментов ДНК из геля на полоску ацетатцеллюлозы, которая впитывает ДНК вместе с содержащейся в геле жидкостью. При этом ДНК фиксируется на полоске. Затем полоску инкубируют в растворе, содержащем радиоактивный зонд. По окончании инкубации ее многократно промывают и проводят радиоавтографию. На полученном в результате отпечатке будут избирательно выявляться лишь те фрагменты ДНК, которые гомологичны радиоактивному зонду. В случае антигенов класса I известно, что большинство членов соответствующего мультигенного семейства имеет высокую степень гомологии. Поэтому при использовании достаточно длинного зонда ДНК оценка числа генов класса I представляется вполне достоверной.

Маргулис и др. [33] и Квист и др. [29], осуществив анализ различных линий мышей методом блоттинга по Саузерну, показали, что примерно 10—15 генов обнаруживают достаточную гомологию с зондами класса I. При использовании этого метода полученное значение числа гомологичных генов оказы-

вается минимальным, поскольку любой большой фрагмент ДНК, дающий положительную реакцию, на самом деле может содержать сразу несколько генов в виде тандемных повторов. В проведенном недавно исследовании, в котором ДНК спермы мышей BALB/c клонировали в виде крупных фрагментов в космидах, было показано, что число генов класса I может быть больше 15. Если обычная геномная библиотека создается из фрагментов размером 10–20 т.п.н., для успешной «упаковки» в космиду требуются фрагменты величиной не менее 32 т.п.н. При анализе космидной библиотеки было выявлено примерно 13 кластеров, содержащих гены класса I, причем в пределах кластера содержалось от 1 до 7 генов. Результаты рестрикционного картирования различных клонов космид указывают на то, что геном BALB/c содержит по меньшей мере 36 генов класса I.

Трудно согласовать наличие 36 генов класса I с числом продуктов этого класса, определяемых серологическим путем и методами структурного анализа белков. Такое несоответствие имеет несколько объяснений, первое из которых связано с наличием псевдогенов. Псевдогены — это гены, которые имеются в геноме, но не транскрибируются в нормальных условиях, поскольку они содержат дефекты в виде нонсенс- или стоп-кодона, локализованных в пределах нормальной кодирующей последовательности. Ряд других дефектов (например, ошибка в сигналах сплайсинга) может привести к тому, что транскрибируемый ген не будет транслирован и соответственно экспрессирован в данном организме. Поэтому, хотя имеются данные о существовании в пределах комплекса H-2 многочисленных генов класса I, нет никаких доказательств, что каждый из этих генов экспрессируется в организме.

Наличие большого числа генов можно объяснить и тем, что некоторые продукты класса I до сих пор не удавалось идентифицировать. Проведенное недавно Космэном и др. [27] исследование клонов кДНК из печени взрослой мыши свидетельствует о реальной возможности существования дополнительных, не выявленных до настоящего времени продуктов класса I. Эти исследователи обнаружили клон кДНК, содержащий кодирующую последовательность, на 88% гомологичную отрезку положений 198–279 аминокислотной последовательности H-2K^b. Однако в отличие от «нормальных» молекул H-2 вместо продолжения в виде гидрофобного участка клон содержал вставки, кодирующие гидрофильные аминокислотные остатки. Весь транскрипт имел длину около 301 аминокислотного остатка и мог бы представлять укороченную форму молекулы H-2. Было высказано предположение, что продукт является секретрируемой формой молекулы H-2, поскольку в нем отсутствовала последовательность, необходимая для закрепления в плазматической мембране. В свете таких наблюдений величина 36 кажется вполне приемлемой для оценки числа генов класса I. Она может отражать существование почти идентичных друг другу генов класса I.

14.3 Антигены класса II

Было показано, что гены, кодируемые в области H-2I, играют решающую роль в осуществлении множества иммунных функций, в том числе в способности реагировать на антиген и осуществлять супрессию иммунного ответа; эти гены определяют целый ряд взаимодействий Т-лимфоцитов с В-лимфоцитами и макрофагами. Кроме того, было установлено, что генетический контроль реакции в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) и реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) осуществляется у мыши генами области I. Сходные функции были картированы в гомологичной области HLA-D/DR человека. Оказалось

также, что эта область связана с предрасположенностью к некоторым заболеваниям и патологическим состояниям. Очевидно, что генетическая гетерогенность человеческих популяций и этические ограничения экспериментов на человеке создают трудности для получения такой детальной информации об области *HLA-D/DR*, которая имеется для области *I* у мыши.

Единственные продукты областей *H-2I* и *HLA-D/DR*, охарактеризованные иммунохимическими методами, — это соответственно антигены *Ia* и *HLA-DR*, которые относят к антигенам класса II. Антигены класса II — крайне полиморфные семейства молекул, имеющих сходную структуру: они построены из двух гликопротеиновых цепей. В отличие от ситуации с молекулами класса I обе цепи антигенов класса II у мыши кодированы в пределах *MHC*. Знание тонкой структуры антигенов класса II представляет большой интерес, поскольку результаты функциональных и генетических исследований говорят о том, что именно с участием антигенов класса II реализуются по крайней мере некоторые иммунологические феномены, контролируемые генами областей *H-2I* и *HLA-D/DR*.

14.3.1. Антигены *Ia* комплекса *H-2* у мыши [42—51]

Хотя с помощью рекомбинантного анализа область *I* можно разделить на пять субобластей *I-A*, *I-B*, *I-J*, *I-E* и *I-C*, только для субобластей *I-A* и *I-E* показано, что они контролируют синтез биохимически определяемых продуктов. Антитела против продуктов субобластей *I-A* и *I-E* преципитируют молекулы, состоящие из двух гликопротеиновых цепей (альфа и бета), характерных для молекул класса II. Имеются сообщения, что ряд растворимых факторов супрессии или стимуляции иммунного ответа имеют антигенные детерминанты класса I, но структурная взаимосвязь между этими факторами и продуктами класса II пока еще неясна.

Молекулы, выявляемые с помощью антител против *I-A*, называются A_α и A_β ; цепь A_α имеет мол. массу около 34—35 кДа, а цепь A_β — 26 кДа. При невозстанавливающих условиях молекулы представлены главным образом в виде комплексов альфа- и бета-цепей с мол. массой 65 кДа, хотя выявляются также небольшие количества свободных цепей A_α и A_β . Эти данные указывают на то, что цепи связаны между собой дисульфидными мостиками. Хотя существует не менее 20 различных гаплотипов *I-A*, их продукты не отличаются друг от друга по молекулярной массе, определяемой с помощью ДСН-ЭПАГ.

Для *I-E* известно меньше гаплотип-специфических вариантов, чем для *I-A*; экспрессия *I-E* варьирует в зависимости от гаплотипа, некоторые гаплотипы не экспрессируют продукты *I-E*. Цепи E_α и E_β экспрессирующих гаплотипов (*k*, *r*, *p* и *d*) различаются по характеру миграции в ДСН-ЭПАГ. Экспериментальное определение молекулярной массы цепи E_α гаплотипов *k* и *r* дает величину, равную 34 кДа, в то время как у соответствующей цепи гаплотипов *p* и *d* мол. масса равна 31 кДа. При восстанавливающих условиях цепи E_β всех экспрессирующих гаплотипов имеют сходный характер миграции, соответствующий мол. массе 28—29 кДа. Наоборот, при невозстанавливающих условиях для цепи E_β гаплотипа *d* определяется значительно меньшая мол. масса — примерно 24 кДа. Такое несоответствие, вероятнее всего, объясняется тем, что после разрушения дисульфидной связи цепь E_β становится менее компактной и изменение конформации приводит к кажущемуся увеличению молекулярной массы. Для других гаплотипов различия между восстановленными и невосстановленными цепями менее выражены. Продукты, выявляемые антителами против субобласти *I-E*, отличаются от продуктов субобласти *I-A* еще и тем, что при

невосстанавливающих условиях они не мигрируют в ДСН-ЭПАГ в виде комплексов альфа- и бета-цепей.

Антигены Ia являются гликопротеинами, о чем свидетельствуют такие факты, как сорбция их на колонках с лектином и способность включать радиоактивно меченные сахара, такие, как маннозу, галактозу, фукозу и глюкозамин. Было показано, что как альфа-, так и бета-цепи молекул I-A и I-E содержат по крайней мере по одной олигосахаридной группе, скорее всего в виде N-связанного сложного углевода. Впрочем, не исключено, что молекулы имеют дополнительные простые углеводные цепи, богатые маннозой. Точная структура углеводной части каждой из цепей до сих пор не установлена, имеются данные, указывающие на некоторую гетерогенность углеводных компонентов на клетках разных типов.

В определенных условиях вместе с продуктами I-A и I-E копреципитирует третья цепь, для которой не выявлены аллельные варианты (различия в зависимости от гаплотипа). Эта инвариантная цепь, получившая название I₁, имеет мол. массу около 31 кДа. Она связана с комплексом альфа- и бета-цепей скорее всего нековалентно, причем сила взаимодействия варьирует для разных гаплотипов. В отличие от цепей альфа и бета, цепь I₁ богата метионином; некоторые данные позволяют предположить, что она имеет олигосахаридную группу, в которую входит манноза, но отсутствуют фукоза и глюкозамин. Поскольку цепь I₁ инвариантна, пока не представляется возможности локализовать кодирующий ее ген в какой-либо конкретной хромосоме.

Первичную структуру цепей альфа и бета изучали с помощью карт триптических пептидов и анализом N-концевых последовательностей. Имеющиеся данные секвенирования пока весьма скудны, и даже полученные сведения ограничены примерно 30 первыми остатками альфа- и бета-цепей, в то время как каждая из этих цепей состоит из более чем 200 аминокислотных остатков. В табл. 14.7 представлены результаты анализа N-концевых последовательностей

Таблица 14.7. N-концевые последовательности антигенов класса II у мыши (по [7] и [45])

Цепь	Гаплотип	5	10	15	20	25	30
A α	k	I A	V Y	V Y		Y	
	b	I A	V Y	V Y		Y	
	d	I A	V F Y	V Y	I	Y	F
	s	I A	V V Y	V Y	I	Y	
E α	k	I K	H T I I	A F Y L L P	R	F M F	F
	d	I	H I I	A F Y L L P		F M F	F
	r	I K	H I I	F Y L L	R	F	
A β	k	S	R H F V A	F P P F	Y F		Y
	b	S	R H F V Y	F	Y F	Y	Y
	d		F V V	F	Y Y		Y
	s		F V F	F	Y F	I	Y
E β	k	V R M S R P	F L	Y K S	F Y	V	Y L Y F
	b	V	P F L	Y	F Y	V	L Y F
	d	V R M S R P	F L	Y V K S L	F Y	V	F L F Y
	r	V R	S R P F L	Y S T S	F Y		
	s	V	F L	Y	F Y		Y

альфа- и бета-цепей продуктов I-A и I-E ряда гаплотипов. Эти данные были получены микросеквенированием с использованием антигенов, меченных радиоактивным атомом в процессе биосинтеза.

В то время как анализ последовательности приносит подробную информацию о небольшом участке молекулы, сравнение карт триптических пептидов

дает общее, хотя и менее детальное представление о всей молекуле. Картирование триптических пептидов эффективно в тех случаях, когда нужно определить, являются ли изучаемые молекулы идентичными, похожими или очень различными, но этот метод не дает информации о точных структурных взаимосвязях. Разные пептиды могут элюироваться вместе и появляться в виде одного пика, но, как правило, результаты, полученные этим методом, могут привести к преувеличенным представлениям о различиях между молекулами. Различие между пептидами даже по одной аминокислоте может привести к различию в характере элюции при использовании техники ионообменной или обратноточной хроматографии.

Как отмечалось ранее, при анализе триптических пептидов мутантных молекул H-2K^b методом ионообменной хроматографии были успешно идентифицированы пептиды, различавшиеся всего лишь по одному аминокислотному остатку. Выявляемые свойства триптических пептидов зависят от того, какие радиоактивно меченные аминокислоты были использованы в работе. Поскольку трипсин расщепляет пептидную цепь с карбоксильной стороны большинства остатков Arg и Lys, мечение этими радиоактивными аминокислотами дает возможность выявить все пептиды, кроме С-концевого. Другие радиоактивные аминокислоты были использованы индивидуально или в смеси для получения пептидных карт. Такой анализ особенно эффективен для решения вопроса о том, идентичны ли исследуемые цепи.

Исходя из данных по секвенированию N-концевых участков и сравнения пептидных карт молекул класса II, можно сделать ряд выводов. Между аллельными продуктами наблюдается больше сходства, чем между цепями A_α, A_β, E_α и E_β, закодированными в одном и том же гаплотипе. Сравнение цепей E_α положительных гаплотипов I-E выявило мало различий. Отмечена идентичность по 16 из 26 доступных для сравнения N-концевых аминокислот, кроме того, при сравнении триптических пептидов наблюдалось 93% совпадений. При сравнении цепей A_α или A_β разных гаплотипов было обнаружено лишь около 50—65% совпадений пептидов, причем цепи A_β характеризуются большей вариабельностью. Отсутствие очевидной гомологии в первичной структуре компонентов альфа- и бета-цепей указывает на то, что каждая цепь кодируется отдельным геном.

Плодотворное исследование выраженного полиморфизма антигенов класса II осуществили Джонс и др. [46, 47], использовавшие метод двумерного электрофореза в геле, разработанный О'Фарреллом [52]. Согласно этому методу, молекулы разделяют в одном направлении в зависимости от заряда с помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) или электрофореза в неравновесном градиенте pH (ЭНГрН), а затем проводят разделение молекул по размерам во втором (перпендикулярном) направлении, используя ДСН-ЭПАГ. Для изучения антигенов Ia обычно используют препараты радиоактивно меченного антигена и результаты двумерного электрофореза регистрируют с помощью радиоавтографии или флюорографии в зависимости от использованного изотопа.

При ИЭФ молекулы мигрируют, пока не достигают положения в стабильном градиенте pH, в котором они уже не имеют заряда; в определенных условиях статическое положение в градиенте pH будет совпадать с изоэлектрической точкой молекулы. Альфа-цепи молекул I-A и I-E имеют сравнительно кислый характер, и их можно разделить с помощью ИЭФ. Бета-цепи более щелочные, для их разделения используют ЭНГрН, в основе ЭНГрН лежат те же принципы, что и в основе ИЭФ, с той лишь разницей, что при ЭНГрН не устанавливается стабильный градиент pH.

На радиоавтографе, полученном после двумерного разделения антигенов класса II выявляется множество бета-пятен, как видно на примере разделения молекул I-E (рис. 14.10), схематическое изображение полученного результата представлено на рис. 14.11. Такой сложный характер распределения может быть связан с посттрансляционными модификациями, влияющими на подвижность молекул, например, дезамидированием остатков глутамина или аспарагина или различием в содержании сиаловых кислот в углеводных цепях. Характер распределения несколько упрощается, если использовать экстракты клеток,

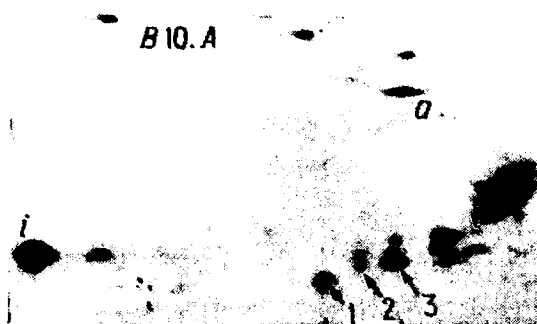


Рис. 14.10. Радиоавтограф двумерного электрофореза в геле продуктов, полученных в результате преципитации антителами против I-E κ лизата клеток B10.A.

Вначале проводили ЭНГрН с крайними значениями pH: *слева* (щелочной край) pH 9 и *справа* (кислый край) pH 4,5. Затем материал подвергли ДСН-ЭПАГ в направлении, показанном на рисунке. Отмечены положения актина (a) (ММ 44 кДа) и инвариантной цепи (i) (ММ 31 кДа). Распределение цепей E α и E β в схематическом виде показано на рис. 14.11. (По [46].)

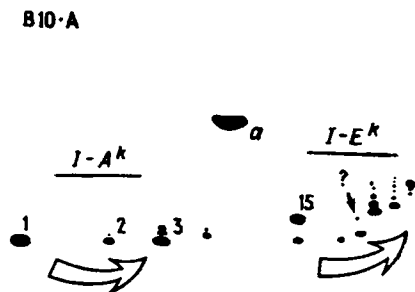


Рис. 14.11. Схема распределения преципитата I-E κ в двумерном электрофорезе в геле, изображенном на рис. 14.10.

Стрелками указано направление, соответствующее увеличению модификаций полипептидной цепи. (По [46].)

выращенных в присутствии туникамицина, ингибирующего присоединение углеводов к аспарагину. Экстракты клеток, обработанных нейраминидазой, также дают более простую картину, и очевидно, что остатки сиаловых кислот могут вносить вклад в гетерогенность молекул. Всю наблюдаемую гетерогенность нельзя, однако, объяснить только различиями в углеводной части молекул.

Изучая Ia-антигены рекомбинантных и гибридных мышей с помощью такого эффективного метода, как двумерный электрофорез в геле, Джонс и др. [46, 47] смогли картировать гены, кодирующие цепи A α , A β , E α и E β . Гены обеих цепей продуктов субобласти I-A расположены в области I-A. Молекула I-E состоит из альфа-цепи, кодируемой в субобласти I-E, и бета-цепи, кодируемой в субобласти I-A; цепь E β иногда обозначают как A ϵ . К таким же выводам относительно цепи E β независимо пришли Кук и др. [42, 43], используя метод пептидных карт для сравнения и идентификации молекул класса Ia. Схема генетической организации и экспрессии молекул I-A и I-E изображена на рис. 14.12. Хотя гены цепей A α , A β и E β картированы в субобласти I-A, точная последовательность расположения генов неизвестна; существует, однако, указание на то, что ген цепи E β расположен справа от генов молекулы I-A.

Антигены области I-E не экспрессируются на поверхности клеток мышей некоторых линий (гаплотипы b, s, f и q). Линии, имеющие гаплотип b и s, про-

дуцируют бета-цепь, кодируемую в области *I-A*, но она остается в цитоплазме клетки и лишь частично гликозилируется. В этих линиях не экспрессируется комплементарная цепь E_α , кодируемая в области *I-E*, а с альфа-цепью антигенов *I-A* цепь E_β не объединяется. Есть сообщения, что у линии с гаплотипом *f* и *q*, которые также не экспрессируют антигены области *I-E*, отсутствует как цепь E_α , так и E_β . Для экспрессии на поверхности клетки любой из цепей (E_α и E_β) необходимо, чтобы в клетке присутствовали как цепь E_β , кодируемая в *I-A*, так и цепь E_α , кодируемая в *I-E*. Гены могут экспрессироваться или в *цис*-, или в *транс*-положении.

Помимо полиморфизма индивидуальных цепей A_α , A_β , E_α и E_β полиморфизм молекул может возникать вследствие комбинаторного сочетания цепей.

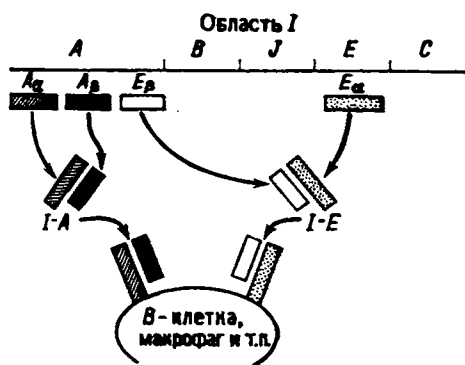


Рис. 14.12. Модель генетической организации и экспрессии аллоантигенов *I-A* и *I-E*. Точный порядок расположения генов в субобласти *I-A* неизвестен. ([51]; печатается с разрешения).



Рис. 14.13. Схематическое изображение возможных вариантов комбинаторных молекул *Ia* в гетерозиготе.

Так, гетерозигота по области *H-2I* может экспрессировать одновременно восемь разных комплексов *Ia* (рис. 14.13). Модель, приведенная на рис. 14.13, постулирует, что оба родительских гаплотипа экспрессируют цепи A_α , A_β , E_α и E_β . Однако, если один из гаплотипов на схеме не экспрессирует продукт E_α , как в случае гаплотипа *b*, остаются лишь два возможных варианта молекул *I-E*. Цепь E_β экспрессируется на поверхности клетки благодаря соединению с цепью E_α , кодируемой в гаплотипе второго родителя, но отсутствие цепи E_α^b устраняет возможность двух других комбинаций.

Корреляция функциональных и структурных данных убедительно свидетельствует в пользу того, что антигены *Ia* являются продуктами генов *Ig*. Было показано, что для реализации контролируемого генами *Ig* иммунного ответа на некоторые антигены необходимо наличие аллелей и *I-A* и *I-E* от линии-респондера (комплементация генов). К тому же недавно были получены данные о корреляции между количественным дефицитом конкретных комплексов $E_\alpha-E_\beta$ на поверхности клетки и соответствующим дефектом в способности клетки презентировать антиген. Дефицит некоторых комплексов $E_\alpha-E_\beta$, вероятно, связан с предпочтительной ассоциацией индивидуальных альфа- и бета-цепей.

14.3.2. Антигены HLA-DR человека [53—72]

Как мы уже отмечали, область *HLA-D/DR* у человека пока еще изучена менее детально, чем область *H-2I* у мыши. Систему *HLA-D* определяют с помощью реакции в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), в то время как *HLA-DR* определяют серологическими реакциями. Между аллелями 1—8 систем *HLA-D* и *DR* наблюдается сильная корреляция, но обнаруженные ассоциации не носят абсолютного характера, и при анализе представителей неевропеоидных рас возникают большие противоречия. Выявление подгрупп *DR*-подобных молекул с помощью аллоантисывороток и моноклональных антител также свидетельствует о сложной структуре этой области. До настоящего времени остается неизвестным число генов, кодирующих молекулы класса II, в пределах области *HLA-D/DR*. Пока еще не удалось точно охарактеризовать строго разграниченные субобласти, подобные субобластям в *H-2I*. Однако данные этого активно развивающегося направления исследований свидетельствуют в пользу существования таких субобластей.

В реакциях с гомозиготными типизирующими клетками (ГТК) выявляется двенадцать аллелей *HLA-D*; ГТК — это лимфоциты доноров, получивших одинаковые аллели *D* от обоих родителей. Лимфоциты лиц, имеющих такой же аллель *D*, не «узнают» ГТК как чужеродные и не пролиферируют в СКЛ, в то время как клетки с другими аллелями реагируют на ГТК пролиферацией в СКЛ. Интерпретация результатов типирования *HLA-D* может быть очень сложной и требует строгого статистического анализа.

С помощью серологических реакций выявляется десять аллелей *HLA-DR*. Популяции клеток, обогащенные В-лимфоцитами, тестируют в комплемент-зависимой лимфодитотоксической реакции, используя аллоантисыворотки, получаемые, как правило, от многократно рожавших женщин. Антисыворотки против *HLA-DR* обычно имеют низкий титр и часто содержат также антитела против *HLA-A, B, C*. Эти антитела необходимо удалять абсорбцией на тромбоцитах, не экспрессирующих антигены *HLA-DR*.

Получение реагентов для антигенов человека резко отличается от ситуации в мышинной системе, где можно провести иммунизацию против интересующих исследователя конкретных участков области *H-2I*. Специфичность антисывороток против *HLA-DR* выясняют в результате тестирования на больших панелях В-лимфоцитов, полученных от разных доноров, в том числе от членов семьи. Помимо сывороток, реагирующих с продуктами аллелей 1—10 системы *HLA-DR*, было выявлено и охарактеризовано несколько групп сывороток, реагирующих определенным образом с множеством специфичностей *HLA-DR*. Определяемые этими сыворотками детерминанты были обозначены как серии антигенов MB и MT. Антигены MB, по-видимому, представляют собой аллельную серию, в то же время антигены MT по современным данным, видимо, не являются аллельными.

Для первоначальной характеристики антигенов класса II человека была использована гетерологичная антисыворотка, полученная путем иммунизации кролика частично очищенной фракцией солюбилизованных папаином антигенов *HLA* от В-лимфобластоидной линии клеток. После тщательной абсорбции Т-клетками сыворотка теряла способность реагировать с ними, но реагировала с В-клетками и преципитировала молекулы класса II, построенные из тяжелой (альфа) (мол. масса 34 кДа) и легкой (бета) (мол. масса 28 кДа) цепей. Сыворотка также сильно ингибировала ответ в СКЛ. В последующих исследованиях антигенов класса II человека использовались гетероантисыворотки, моноклональные антитела и аллоантисыворотки. Гетероантисыворотки и большинство

моноклональных антител выявляют мономорфные детерминанты и поэтому реагируют с В-лимфоцитами всех типов DR. Уточнение взаимосвязей между молекулами, определяемыми этими антителами против мономорфных структур, и молекулами, несущими аллельные специфичности и определяемыми с помощью аллоантисывороток, представляет непростую задачу.

14.3.2.1. Первичная структура антигенов DR

Ввиду перечисленных трудностей на пути изучения молекул класса II человека представляется особенно замечательным успешное определение полной последовательности 198 аминокислотных остатков N-конца бета-цепи. В лаборатории Хильшмана [61] с помощью главным образом биохимических методов были осуществлены выделение и очистка альфа- и бета-цепей HLA-DR из лимфобластной линии клеток, полученных от донора, гомозиготного по *HLA-Dw2/DR2*. Хотя для антигенной характеристики выделенных продуктов не были использованы аллоиммунные сыворотки, эти продукты предположительно содержали молекулы HLA-DR. Молекулярные комплексы HLA-DR получали с помощью двуступенчатой процедуры, используя вначале ионообменную, а затем гель-фильтрационную хроматографию. Разделение альфа- и бета-цепей из комплексов HLA-DR проводили на колонке гидроксипатита.

Таблица 14.8. Сравнение аминокислотной последовательности бета-цепи HLA-DR2 второго и третьего внеклеточных доменов HLA-B7¹⁾

	1	2	3	4	5
HLA-DR ²⁾	G D T R P R F L W Q P K R E C H F F N G T E R V R F L D R Y F Y N Q E E S V R F D S D V G E F R A V				
HLA-B7 ²⁾	Q S E A G S H T L - S M Y G - D V G P D G R L L - G H - Q - A - D G K D Y I A L N E - L R S W T - A				
	9	10	11	12	13
	6	7	8	9	10
DR ₁	T E L G R P D A E Y W N S Q K D I L E Q A R A A V D T Y C R H N Y G V V E S F T V Q R R V Q P K V T				
B7	[] D T A A Q I T Q R K W E A A R E A - - R - - Y L E G E - V E W L R R Y L E N G K D K L E R A D P P				
	14	15	16	17	18
	11	12	13	14	15
DR ₁	[] V Y P S K T Q P L Q H N L L V C S V S G F Y P G S I E V R W F L N G Q E E K A G M V S T G L I Q D				
B7	K T H V T H N P I S D - E A T - R - W A L - - - - A E - T L T - Q R D - E D Q T Q D T E L V E T R P A				
	19	20	21	22	23
	16	17	18	19	20
DR ₁	G D W T F Q T L V M L E T V P R S G E V Y T C Q V E H P S V T S P L T V E W R A R S E S A Q S K M				
B7	- - R - - E K W A A V V P S G E E Q R - - - H - Q - E G L P K - - - L R - E P S - Q - T V P V				
	24	25	26	27	28

¹⁾ При сопоставлении последовательности располагают так, чтобы совместить гомологичные остатки Cys. Черточки (-) обозначают гомологию с DR2_β; скобки [] обозначают вставки, использованные для получения максимальной гомологии.

²⁾ Этот антиген был выделен из клеточной линии, полученной из клеток донора, гомозиготного по *HLA-Dw2/DR2*. Представленная последовательность является последовательностью большей части (70%) изученной бета-цепи [61].

³⁾ Числа под последовательностью соответствуют положениям в молекуле HLA-B7; последовательность HLA-B7 приведена из работы Опп и др. [13].

Бета-цепь HLA-DR состоит из двух доменов, в каждом из которых имеется внутренний дисульфидный мостик. В этом отношении молекула напоминает молекулы МНС класса I и иммуноглобулины. В табл. 14.8 сравниваются последовательности бета-цепи HLA-DR2 и второго и третьего внеклеточных доменов молекулы HLA-B7. Для точного совмещения остатков Cys оказалось достаточным лишь допустить по одной делеции в молекуле B7 и в бета-цепи. В положе-

нии 19 бета-цепи находится углеводная группа, соединенная с остатком аспарагина по азоту.

Изображенная в табл. 14.8 последовательность характерна примерно для 70% молекул в препарате бета-цепей, что было установлено по выходу пептидов. Остальные 30% молекул оказались гетерогенными; при расщеплении молекулы протеиназой *Staphylococcus aureus* (SV8) наибольшая вариабельность была обнаружена в пептиде, включающем аминокислоты 60—69 (табл. 14.9). Большинство

Таблица 14.9. Последовательности семи пептидов, полученных из бета-цепей HLA-DR2.2¹⁾ [61] (печатаются с разрешения)

	60									69
1)	Y	W	N	S	Q	K	D	I	L	E
2)	—	—	—	—	—	—	—	F	—	—
3)	—	—	—	—	—	—	—	F	V	—
4)	—	—	—	—	—	—	—	E	—	—
5)	—	—	—	—	—	—	E	V	—	—
6)	—	—	—	—	—	M	—	F	—	—
7)	—	—	—	—	—	M	—	—	—	—

¹⁾ Последовательности семи пептидов, выделенных из бета-цепей HLA-DR2, обработанных протеиназой *Staphylococcus aureus* (SV8). Ряд 1 отражает последовательность большинства (70%) бета-цепей; ряды 2—7 — последовательности пептидов остальных 30% бета-цепей.

найденных в этом участке аминокислотных замен могут быть следствием замены одного нуклеотида. При изоэлектрофокусировании препарата бета-цепей в цитруемом исследовании было получено 7—9 полос, соответствующих изоэлектрическим точкам в интервале рН 5,5—8,3. Эти данные в сочетании с обнаруженной гетерогенностью пептидов бета-цепи дают основание думать, что существует по меньшей мере семь генов бета-цепей HLA-DR.

14.3.2.2. Сравнение продуктов областей DR и I

Хотя до настоящего времени нельзя говорить о наличии абсолютных корреляций, можно констатировать, что продукты DR- и I-E-областей гомологичны друг другу в большей степени, чем продукты DR- и I-A-областей. Отмечена гомология между N-концевыми последовательностями бета-цепи, закодированной в HLA-DR2, и бета-цепей, закодированных в других аллелях HLA-DR, а также гомология между этими последовательностями и последовательностями цепей E_β мыши. Гомология с A_β-цепями выражена минимально. В табл. 14.10

Таблица 14.10. N-концевые последовательности бета-цепей класса II

		1	5	10	15	20	25	30	Гомология ¹																								
HLA-DR	2/2	G	D	T	R	P	R	F	L	W	Q	P	K	R	E	C	H	F	F	N	G	T	E	R	V	R	F	L	D	R	Y	F	
HLA-DR	4/6 ²	G	D	T	P	E	R	F	L	E	Q	V																					7/11
HLA-DR	8/8 ²	G	D	T																													5/5
HLA-DR	6 ²				P	F	L	Y	Y	V					F	F								V		L						7/10	
H-2I ^E ³		V	R	M	S	R	P		F	L		Y	K	S				F	Y					V	Y	L		Y	F			9/18	
H-2I ^A ³			S	R	H	F	V	A		F	P	P	F	Y	F										Y		Y					2/14	

¹⁾ Отношение числа идентичных остатков к числу остатков, по которым можно было проводить сравнение, используя последовательность HLA-DR 2/2; в качестве прототипа взята последовательность HLA-DR 2/2 из работы Крацина и др. [61].

²⁾ Последовательность из работы Стромингера и др. [70].

³⁾ Последовательность из работы Мак-Кина [7].

представлены *N*-концевые последовательности бета-цепей HLA-DR трех клеточных линий и бета-цепей A_β и E_β мыши с гаплотипом *k*. *N*-концевые последовательности альфа-цепей человека также в большей степени гомологичны цепям E_α мыши, чем цепям A_α . Сравнение *N*-концевых последовательностей альфа-цепей DR четырех клеточных линий с E_α - и A_α -цепями мыши гаплотипа *k* приведено в табл. 14.11. Данные секвенирования других молекул человека

Таблица 14.11. *N*-концевые последовательности альфа-цепей класса II¹⁾

HLA-DR	4/6	I	K	E	E	5			V		Q	10	A	E	F	Y	L	N	15		20		25		
										I															
HLA-DR	4/6	I	K	E	E	R	V	I		L	Q	A	E		F	Y	L	N	Y	D	F	Q	G		
HLA-DR	8/8	I	K	E	E		V	I				A			F		L	L				F	G		
HLA-DR	6/					H	V								F	Y	L		P			F	M		
H-21E ^k		I	K			H	T	I	I			A			F	Y	L	L	P		R		F	M	
H-21-A ^k					I		A			V					Y			V	Y					F	Y

¹⁾ Последовательности HLA-DR приведены по данным Строминжера и др. [70]. Последовательности H-21 приведены по данным Фрида [45].

(кроме бета-цепи HLA-DR2) слишком ограничены и поэтому не могут быть использованы для анализа структурных различий аллелей.

Несмотря на отсутствие гомологии между первыми изученными продуктами HLA-DR и мышинными антигенами I-A, более поздние данные позволяют предполагать существование аналогов I-A у человека. Гойерт и др. [57], используя полученные от игоночных обезьян моноклональные антитела против молекул класса II, гомологичных по *N*-концевым участкам с альфа- и бета-цепями I-A мыши, идентифицировали молекулы класса II человека, получившие название DS. В выделенных с помощью этих антител молекулах класса II у человека альфа-цепи были гомологичны альфа-цепям I-A мыши по *N*-концевому участку. Антитела выявляли молекулы DS лишь на клетках с гаплотипом *HLA-DR7* и не обнаруживали их на клетках с другими аллелями *DR*. Недавно была получена кроличья антисыворотка, которая, по-видимому, выявляет молекулы DS на клетках с любым аллелем *DR*; применение такой сыворотки должно облегчить изучение аналогов I-A у человека.

14.3.2.3. Полиморфизм альфа- и бета-цепей DR

Сравнительное изучение альфа- и бета-цепей класса II у человека путем анализа триптических пептидов проводили в нескольких лабораториях. В этих исследованиях использовали разные методы разделения пептидов и разные радиоактивно меченные аминокислоты. Во всех случаях для получения препаратов альфа- и бета-цепей молекулы фракционировали по размерам в ДСН-ЭПАГ. Хотя, согласно большинству работ, бета-цепь более полиморфна, была выявлена также гетерогенность пептидов альфа-цепей. Поскольку в гомозиготной линии клеток было обнаружено семь вариантов бета-цепей (табл. 14.9), то вполне возможно, что использование для разделения цепей других методов, основанных не на различии размеров, приведет к иным результатам.

Антигены класса II клеточных линий, гомозиготных по *HLA-DR*, исследовали с помощью двумерного электрофореза в геле. Как и в случае антигенов класса II мыши, распределение имело сложный характер и состояло из нескольких «пятен» альфа- и бета-цепей. Две независимые группы исследователей изу-

чили большое количество гомозиготных по *HLA-DR* клеточных линий, проводя преципитацию молекул класса II моноклональными антителами против мономорфных детерминант. Применяя разные модификации двумерного электрофореза в геле, обе группы обнаружили, что бета-цепь более полиморфна; распределение пятен, соответствующих альфа-цепям, было сходным для всех линий клеток, в то время как распределение бета-цепей разных линий значительно различалось.

14.3.2.4. Серологический анализ продуктов *HLA-D/DR*

Субпопуляции молекул класса II идентифицировали с помощью аллоантисывороток и моноклональных антител. В некоторых случаях анализ включал в себя последовательную иммунопреципитацию, в других — сравнивали результаты двумерного электрофореза в геле молекул, преципитированных аллоантисыворотками или моноклональными антителами разной специфичности. Большинство молекул класса II можно осадить из лизата клеток с помощью аллоантисывороток против *HLA-DR*.

Первые сведения о молекулах класса II, отличных от *HLA-DR*, были получены при использовании антисывороток против специфичности, обозначенной DC1. Впоследствии оказалось, что антисыворотки MB1, MT1 и LB12 проявляют такой же характер цитотоксичности и осаждают из клеточных лизатов такие же молекулы, как и антисыворотка DC1. Преципитируемые этими сыворотками альфа- и бета-цепи отличаются от цепей, преципитируемых анти-*DR*-сыворотками. Кроме того, было показано, что молекулы, реагирующие с сывороткой DC1, чувствительны к ограниченному протеолизу папаином, что также отличает их от молекул *HLA-DR*.

Субпопуляции молекул класса II, отличающиеся друг от друга характерными альфа- и бета-цепями, были обнаружены также с помощью 1) аллоантисывороток различной специфичности, 2) ксеноантисыворотки против полиморфных детерминант, и 3) моноклональных антител против мономорфных структур. Используемые в работах клеточные линии имеют разные аллели *HLA-DR* и связанные с ними специфичности MB и MT. По некоторым данным антигены SB, которые экспрессированы на В-лимфоцитах и определяются в тесте примированных лимфоцитов (ТПЛ), являются молекулами класса II. Антигены SB были картированы в хромосоме 6, между *HLA-DR* и *GLO*. Моноклональные антитела, подавляющие реакцию ТПЛ против специфических аллелей SB, способны также осажждать молекулы класса II.

Несмотря на значительный объем сведений, подклассы антигенов *HLA* класса II изучены недостаточно полно. Одно из возможных затруднений состоит в том, что молекулярные взаимосвязи между разными продуктами класса II могут быть неодинаковыми в клетках разных линий. Кроме того, антитела, используемые для выделения антигенов, способны реагировать с общими или перекрестно-реактивными детерминантами, присущими молекулам разных подклассов. Дополнительная трудность связана с отсутствием четких представлений о генотипе клеток, используемых для характеристики разных подклассов антигенов. Гетерогенность альфа- или бета-цепей из клеток, не являющихся истинными гомозиготами, может просто отражать аллельные вариации одного и того же подкласса молекул.

Многие данные свидетельствуют о существовании нескольких разных подклассов молекул класса II у человека; приблизительная оценка указывает на три таких подкласса. Можно предполагать, что заболевания, связанные с определенными аллелями *HLA-D* или *DR*, имеют гораздо более тесную ассоциацию

с. подклассами молекул класса II. Характеристика молекул этих подклассов является первым шагом на пути подробного анализа области *HLA-D/DR* и картируемых в этой области функций.

14.3.3. Гены, кодирующие антигены класса II

В последнее время начинают появляться работы, посвященные описанию генов класса II, и сейчас мы уже имеем некоторые сведения о генах *DR* человека [73—75]. По всей вероятности, в изучении генов, кодирующих антигены класса II мыши и человека, в ближайшем будущем произойдет «информационный взрыв».

Ли и др. [74] выделяли мРНК из *HLA-DR*-положительной линии лимфо-бластоидных В-клеток человека, трансформированных вирусом Эпштейна—Барр. Фракцию мРНК, имеющую молекулы определенного размера, использовали для синтеза кДНК, которую затем встраивали в плазмиды. Был произведен отбор плазмид, способных гибридизироваться с мРНК, осуществляющей синтез продуктов *DR* в бесклеточной системе трансляции. Продукты *HLA-DR* преципитировали из системы трансляции с помощью гетерологичной антисыворотки против *HLA-DR* и определяли молекулярную массу транслированных белков в ДСН-ЭПАГ. В результате такого подхода исследователям удалось выделить два клона кДНК (*pDR H1* и *pDR H2*), кодирующие тяжелую цепь *HLA-DR*.

В пользу утверждения, что эти клоны кодируют тяжелую цепь *HLA-DR*, свидетельствует следующее обстоятельство: мРНК, способная к гибридизации с клонами *pDRH*, присутствовала в В-лимфоцитах и не выявлялась в фибробластах и Т-лимфоцитах. Таким образом, экспрессия мРНК совпадала с экспрессией *HLA-DR* клетками конкретного типа. Кроме того, была определена частичная нуклеотидная последовательность 5'-конца одного из клонов. Эта последовательность и соответствующая последовательность аминокислот приведены в табл. 14.11. Теоретически выведенная последовательность аминокислот была идентична последовательности белка альфа-цепи, полученной в другой лаборатории, и гомологична известным последовательностям альфа-цепи (табл. 14.12).

Клоны *pDRH* гибридизировались с ДНК гибридов соматических клеток мыши и человека, содержавших хромосому 6 человека, и не гибридизировались с ДНК гибридов, утративших эту хромосому. Было показано, что комплекс *HLA* картируется в коротком плече хромосомы 6. Хотя конкретный сегмент хромосомы, реагировавший с клонами *pDRH*, не был идентифицирован, полученные данные позволяют предполагать, что гены, кодирующие альфа-цепь *HLA-DR*, расположены в области *HLA*.

С помощью блоттинга по Саузерну в ДНК линии клеток человека, гидролизованной *EcoRI*, была обнаружена полбса, соответствующая молекулам длиной 3,4 т.п.н.; при анализе ДНК соматических гибридов человека и мыши, имевших хромосому 6 человека, наряду с этим фрагментом выявлялся еще один, размером 3,1 т.п.н. Оба фрагмента выявлялись в ДНК человека, обработанной рестриктазой *HindIII*. Такое простое распределение по рестрикционным фрагментам дает основание полагать, что в геноме содержится очень мало копий гена тяжелой цепи *HLA-DR*.

Кормэн и др. [73] также получили клоны кДНК, по-видимому соответствующие генам тяжелых цепей *HLA-DR*. Эти исследователи применили метод иммуноселекции полисом с помощью моноклональных антител, реагирующих со свободными тяжелыми цепями *HLA-DR*, для выявления препаратов, обо-

Таблица 14.12. N-концевая белковая последовательность и 5'-концевая нуклеотидная

5' ...	Ile	Lys	Glu	Glu	His	Val	Ile	Ile	Gln
	ATC	AAA	GAA	GAA	CAT	GTG	ATC	ATC	GAG

гашенных молекулами мРНК тяжелой цепи. Были получены два клона кДНК, обозначенные pDR H-1 и pDR H-2; оба клона, видимо, содержат 3'-нетранслируемый район. Один клон содержит последовательности, которые, вероятнее всего, соответствуют С-концевому гидрофильному внутриклеточному участку и части гидрофобной трансмембранной области.

Лархэммер и др. [75] сообщили о полной расшифровке последовательности клона кДНК, видимо кодирующей бета-цепь DR. В табл. 14.13 аминокислотная

Таблица 14.13. Сравнение последовательностей бета-цепей DR

ДНК² RDSPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVHLVSRSIYNREEVVRFDSDVGEFRAV
Белок³ G-TRPR-LW-P-RE-H-F-----FLD-YF--Q--S-----

ДНК² TLLGLPAAEYWNSQKDILERKRAAVDRVCRHNYQLELRITTLQRRVEPTVT
Белок³ -E--R-D-----QA-----TY-----GVVESF-V---Q-K--

ДНК² ISPSRTEALNHHNLLVCSVTDFYPAQIKVRWFRNDQEETAGVVTPLIRN
Белок³ VY--K-QP-Q-----SG--GS-E---L-G--K--M---G--QD

ДНК² GDWTFQILVMLEMTPORGDVYTCHEHPSLOSPITVEMRAQSESAQSKM
Белок³ -----T-----TV-RS-E-----Q-----VT--L-----R-----

ДНК² LSGIGGFVLGLIFLGLGLIIHHRSSQKGLLH

¹ Положения аминокислот представлены в соответствии с последовательностью ДНК и не отражают вставки.

2 Аминокислотная последовательность была определена теоретически на основе последовательности клонированной ДНК; из работы Лархэммера и др. [30].

3 Последовательность белка приведена из работы Крацина [61].

последовательность, установленная на основе нуклеотидной последовательности ДНК, сопоставляется с аминокислотной последовательностью соответствующего белка — бета-цепи DR-2 (см. табл. 14.8). Для получения максимальной гомологии потребовалась вставка одной аминокислоты в белковую последовательность. Поскольку клон кДНК был получен из гетерозиготной клеточной линии (DR4,w6), различия в последовательностях, связанные с аллельной вариабельностью, можно было предвидеть. Однако гомология между последовательностью реального белка и теоретически полученной аминокислотной последовательностью составляет лишь 68%, т. е. величину, гораздо меньшую, чем гомология между разными аллельными вариантами молекул класса I. Поэтому можно предположить, что эти две последовательности бета-цепей представляют разные подклассы молекул класса II. Следует отметить, что последовательность аминокислот, выведенная из последовательности ДНК, и последовательность реального белка идентичны в участке из 9 аминокислот, который, судя по результатам секвенирования белков, является вариабельным.

последовательность альфа-цепи HLA-DR [74] (печатается с разрешения)

Ala	Glu	Phe	Tur	Leu	Asn	Pro	Asp	...	3'
GCC	GAG	TTC	TAT	GTG	AAT	CCT	GAC		

Большие возможности техники клонирования гена делают этот метод важнейшим инструментом исследования при определении числа генов класса II и их организации. Прямое зондирование клеточной ДНК и РНК поможет осуществить идентификацию генов, контролирующих функции, картированные в областях *H-2I* и *HLA-D/DR*.

Заключение

MHC содержит серию генов, определяющих разнообразные иммунологические феномены. На основании структурных и функциональных особенностей продукты этих генов можно подразделить на три основные категории, обозначаемые как классы I, II и III. Настоящая глава была посвящена антигенам классов I и II человека и мыши. Антигены класса III являются компонентами комплемента; их структура и функции детально изложены в гл. 24.

К настоящему времени накоплены обширные сведения относительно первичной структуры молекул класса I и кодирующих их генов. Хотя антигены класса I участвуют в ряде иммунологических реакций, их конкретные функции пока не установлены. Эта проблема осложнилась еще больше, когда было установлено, что в геноме гомозиготных инбредных животных содержится около 36 разных генов, кодирующих антигены класса I. Вполне возможно, что некоторые из этих генов не функционируют, однако остается необходимость выяснить функцию экспрессируемых генов и определить, выполняют ли различные продукты разные или перекрывающиеся функции. Изучение антигенов мутантных линий мышей и антигенов доноров, серологически идентичных по HLA, но дифференцируемых в реакциях ЦТЛ, позволит получить информацию об активных участках структур, распознаваемых в определенных иммунологических реакциях.

Сегодня быстро развиваются детальные исследования антигенов класса II и кодирующих генов, и можно ожидать, что в ближайшем будущем удастся определить полную первичную структуру альфа- и бета-цепей двух или более локусов класса II. Предварительные данные показывают, что эти антигены представляют структуры из доменов, имеющих дисульфидные связи, подобно антигенам класса I и иммуноглобулинам. Получение очищенных фракций молекул класса II разных локусов должно помочь конкретизации их функциональных свойств. Структурные исследования помогут также ответить на следующий вопрос: контролируются ли функции, картируемые в областях *H-2I* и *HLA-D/DR*, молекулами класса II или же эти свойства присущи другим тесно сцепленным генам? Применение очищенных антигенов поможет разрешить многие волнующие вопросы, связанные с ролью этих белков в осуществлении иммунологической реактивности и ассоциацией их с различными заболеваниями.

Хотя многое в структуре продуктов *MHC* и самих генах *MHC* остается неясным, в этой области уже возникли новые плодотворные экспериментальные направления. Можно с оптимизмом утверждать, что знание этого генного комплекса и его продуктов не только принесет успешное разрешение сегодняшних вопросов, но и откроет новые перспективы для биомедицинских исследований.

ЖИТЕПАТЫРА

1. Coligan J. E., Kindt T. J. Determination of protein primary structure by radiochemical techniques, *J. Immunol. Methods*, **47**, 1—11 (1981).
2. Coligan J. E., Kindt T. J., Uehara H., Martinko J., Nathenson S. G. Primary structure of a murine transplantation antigen, *Nature*, **291**, 35—39 (1981).
3. Cook R., Carroll M. C., Uhr J. W., Vitetta E. S., Capra J. D. Studies on the protein products of murine chromosome 17: A status report, *Transplant. Proc.*, **10**, 695—699 (1978).
4. Klein J. H-2 mutations: Their genetics and effect on immune functions, *Adv. Immunol.*, **26**, 55—146 (1978).
5. Nairn R., Yamaga K., Nathenson S. G. Biochemistry of the gene products from murine MHC mutants, *Annu. Rev. Genet.*, **14**, 241—277 (1980).
6. Nathenson S. G., Uehara H., Ewenstein B. M., Kindt T. J., Coligan J. E. Primary structural analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 1025—1052 (1981).
7. McKean D. J. Microsequencing and its applications in immunology, *Crit. Rev. Immunol.*, **2**, 259—296 (1981).
8. Silver J. Genetic and structural organization of murine Ia and human DR antigens, *Crit. Rev. Immunol.*, **2**, 225—257 (1981).
9. Strominger J. L. Structure of products of the major histocompatibility complex in man and mouse, *Prog. Immunol.*, **4**, 541—554 (1980).
10. Vitetta E. S., Capra J. D. The protein products of the murine 17th chromosome: Genetics and structure, *Adv. Immunol.*, **26**, 147—188 (1978).
11. Biddison W. E., Krangel M. S., Strominger J. L., Ward F. E., Shearer G. M., Shaw S. Virus-immune cytotoxic T cells recognise structural differences between serologically indistinguishable HLA-A2 molecules, *Hum. Immunol.*, **1**, 225 (1980).
12. Kindt T. J. A common evolutionary origin for class I molecules of the MHC and Tla region, *Immunol. Today*, **2**, 169—170 (1981).
13. Orr H. T., Lopez de Castro J. A., Parham P., Ploegh H. L., Strominger J. L. Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: Location of putative alloantigenic sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4395 (1979).
14. Strominger J. L., Orr H. T., Parham P., Ploegh H. L., Mann D. L., Bilofsky H., Saffroff H. A., Wu T. T., Kabat E. A. An evaluation of the significance of amino acid sequence homologies in human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) with immunoglobulins and other proteins, using relatively short sequences, *Scand. J. Immunol.*, **11**, 573—592 (1980).
15. Tragardh L., Rask L., Wiman K., Fohlman J., Peterson P. A. Complete amino acid sequence of pooled papainsolubilized HLA-A, -B, and -C antigens: Relatedness to immunoglobulins and internal homologies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1129—1133 (1980).
16. Cook R. G., Rich R. R., Flaherty L. The Qa-1 alloantigens. I. Identification and molecular weight characterization of glycoproteins controlled by the Qa-1_a and Qa_b alleles, *J. Immunol.*, **127**, 1894—1898 (1981).
17. McIntyre K. R., Hammerling U., Uhr J. W., Vitetta E. S. Structural analysis of thymus-leukemia (TL) antigens in the mouse, *J. Immunol.*, **128**, 1712—1717 (1981).
18. Michaelson J., Flaherty L., Bushkin Y., Yudkowitz H. Further biochemical data on Qa-2, *Immunogenetics*, **14**, 129—140 (1981).
19. Soloski M. J., Uhr J., Vitetta E. S. Primary structural studies of the Qa-2 alloantigen: Implications for the evolution of the major histocompatibility complex, *Nature*, **296**, 759—761 (1982).
20. Stanton T. H., Hood L. Biochemical identification of the Qa-1 alloantigen, *Immunogenetics*, **11**, 309—314 (1980).
21. Gates III, F. T., Coligan J. E., Kindt T. J. Complete amino acid sequence of murine β_2 -microglobulin: Structural evidence for strain-related polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 554—558 (1981).
22. Carroll M. C., Passmore H. C., Capra J. D. Structural studies on the murine fourth component of complement (C4) IV. Demonstration that C4 and SIp are encoded by separate loci, *J. Immunol.*, **124**, 1745—1749 (1980).
23. Parker K. L., Shreffler D. C., Capra J. D. Partial amino acid sequences of the murine fourth component of complement (C4): Demonstration of homology with human C4 and identification of the amino-terminal subunit in pro-C4, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4275—4278 (1980).
24. Shimada A., Nathenson S. G. Solubilization of membrane H-2 isoantigens: Chromatographic separation of specificities determined by a single H-2 genotype, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 828—833 (1967).

25. Hess M., Davies D. A. L. Basic structure of mouse histocompatibility antigens, *Eur. J. Biochem.*, **41**, 1—13 (1974).
26. Berggård I., Bearn A. G. Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids, *J. Biol. Chem.*, **243**, 4095—5103 (1968).
27. Cosman D., Khoury G., Jay G. Three classes of mouse H-2 messenger RNA distinguished by analysis of cDNA clones, *Nature*, **295**, 73—76 (1982).
28. Goodenow R. S., McMillan M., Orn A., Nicolson M., Davidson N. Identification of a BALB/c H-2L^d gene by DNA-mediated gene transfer, *Science*, **215**, 677—679 (1982).
29. Kvist S., Bregegere F., Rask L., Cami B., Garoff H., Daniel F., Wiman K., Larhammar D., Abastado J. P., Gachelin G., Peterson P. A., Dobberstein B., Kourilsky P. cDNA clone coding for part of a mouse H-2^d major histocompatibility antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2772—2776 (1981).
30. Larhammar D., Schenning L., Gustafsson K., Wiman K., Claesson L., Rask L., Peterson P. A. Complete amino acid sequence of an HLA-DR antigen-like beta chain as predicted from the nucleotide sequence: Similarities with immunoglobulins and HLA-A, -B, and -C antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3687—3691 (1982).
31. Malissen M., Malissen B., Jordan B. R. Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 893—897 (1981).
32. Maloy W. L., Coligan J. E. Primary structure of the H-2D^b alloantigen. II. Additional amino acid sequence information, localization of a third site of glycosylation and evidence for K and D region specific sequences, *Immunogenetics*, **16**, 11—22 (1982).
33. Margulies D. H., Evans G. A., Flaherty L., Seidman J. G. H-2-like genes in the Tla region of mouse chromosome 17, *Nature*, **295**, 168—170 (1982).
34. Moore K. W., Sher B. T., Sun Y. H., Eakle K. A., Hood L. DNA sequence of a gene encoding a BALB/c mouse L^d transplantation antigen, *Science*, **215**, 679—682 (1982).
35. Parnes J. R., Velan B., Felsenfeld A., Ramanathan L., Ferrini U., Appella E., Seidman J. G. Mouse β_2 -microglobulin cDNA clones: A screening procedure for cDNA clones corresponding to rare mRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2253—2257 (1981).
36. Ploegh H. L., Orr H. T., Strominger J. L. Molecular cloning of a human histocompatibility antigen cDNA fragment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6081—6085 (1980).
37. Reyes A. A., Johnson M. J., Schold M., Ito H., Ike Y., Morin C., Itakura K., Wallace R. B. Identification of an H-2K^b-related molecule by molecular cloning, *Immunogenetics*, **14**, 383—392 (1981).
38. Reyes A. A., Schold M., Wallace R. B. The complete amino acid sequence of the murine transplantation antigen H-2D^b as deduced by molecular cloning, *Immunogenetics*, **16**, 1—9 (1982).
39. Sood A. K., Pereira D., Weissman S. M. Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligodeoxynucleotide primer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 616—620 (1981).
40. Steinmetz M., Moore K. W., Frelinger J. G., Sher B. T., Shen F.-W., Boyse E. A., Hood L. A pseudogene homologous to mouse transplantation antigens: Transplantation antigens are encoded by eight exons which correlate with protein domains, *Cell*, **25**, 683—692 (1981).
41. Steinmetz M., Winoto A., Minard K., Hood L. Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens, *Cell*, **28**, 489—498 (1982).
42. Cook R. G., Uhr J. W., Capra J. D., Vitetta E. S. Structural studies on the murine Ia alloantigens. II. Molecular weight characterization of the products of the I-A and I-E/C subregions, *J. Immunol.*, **121**, 2205—2212 (1978).
43. Cook R. G., Vitetta E. S., Uhr J. W., Capra J. D. Structural studies on the murine Ia alloantigens. V. Evidence that the structural gene for the I-E/C beta polypeptide is encoded within the I-A subregion, *J. Exp. Med.*, **249**, 981—986 (1979).
44. Cullen S. E., Kindle C. S., Shreffler D. C., Cowing C. Differential glycosylation of murine B cell and spleen adherent cell Ia antigens, *J. Immunol.*, **127**, 1478—1484 (1981).
45. Freed J. H. Biochemistry of the murine Ia antigens. In: *Ia Antigens and Their Analogs in Man and Other Animals*, Vol. 1, ed. by S. Ferrone and C. David, CRC Press, Florida, pp. 1—37, 1982.
46. Jones P. P., Murphy D. B., McDevitt H. O. Two-gene control of the expression of a murine Ia antigen, *J. Exp. Med.*, **148**, 925—939 (1978).
47. Jones P. P., Murphy D. B., McDevitt H. O. Variable synthesis and expression of E_a and A_e (E) Ia polypeptide chains in mice of different H-2 haplotypes, *Immunogenetics*, **12**, 321—337 (1981).
48. Matis L. A., Jones P. P., Murphy D. B., Hedrick S. M., Lerner E. A., Janeway Jr., C. A., McNicholas J. M., Schwartz R. H. Immune response gene function correlates with the expression of an Ia antigen II. A quantitative deficiency in Ae: E_a complex expression causes a corresponding defect in antigen-presenting cell function, *J. Exp. Med.*, **155**, 508—523 (1982).

49. McMillan M., Frelinger J. A., Jones P. P., Murphy D. B., McDevitt H. O., Hood L. Structure of murine Ia antigens two-dimensional electrophoretic analyses and highpressure liquid chromatography tryptic peptide maps of products of the I-A and I-E subregions and of an associated invariant polypeptide, *J. Exp. Med.*, 153, 936—950 (1981).
50. McNicholas J. M., Murphy D. B., Matis L. A., Schwartz R. H., Lerner E. A., Janeway Jr., C. A., Jones P. P. Immune response gene function correlates with the expression of an Ia antigen I. Preferential association of certain Ae and E α chains results in a quantitative deficiency in expression of an Ae: E α complex, *J. Exp. Med.*, 155, 490—507 (1982).
51. Uhr J. W., Capra J. D., Vitetta E. S., Cook R. G. Organization of the immune response genes, *Science*, 206, 292—297 (1979).
52. O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.*, 250, 4007—4021 (1975).
53. Carrel S., Tosi R., Gross N., Tanigaki N., Carmagnola A. L., Accolla R. S. Subsets of human Ia-like molecules defined by monoclonal antibodies, *Mol. Immunol.*, 18, 403—411 (1981).
54. Charron D. J., McDevitt H. O. Characterization of HLA-D-region antigens by two-dimensional gel electrophoresis, *J. Exp. Med.*, 153, 18s—36s (1980).
55. Corte G., Calabi F., Damiani G., Bargellesi A., Tosi R., Sorrentino R. Human Ia molecules carrying DCl determinants differ in both α - and β -subunits from Ia molecules carrying DR determinants, *Nature*, 292, 357—360 (1981).
56. de Kretser T. A., Crumpton M. J., Bodmer J., Bodmer W. F. Demonstration of two distinct light chains in HLA-DR associated antigens by two dimensional gel electrophoresis, *Eur. J. Immunol.*, 12, 214—221 (1982).
57. Goyert S. M., Shively J. E., Silver J. Biochemical characterization of a second family of human Ia molecules, HLA-DS, equivalent to murine I-A subregion molecules, *J. Exp. Med.*, 156, 550—556 (1982).
58. Karr R. W., Kannapell C. C., Stein J. A., Gebel H. M., Mann D. L., Duquesnoy R. J., Fuller T. C., Rodey G. E., Schwartz B. D. Molecular relationships of the human B cell alloantigens, MT2, MB3, MT4 and DR5, *J. Immunol.*, 128, 1809 (1982).
59. Katagiri M., Ikeda H., Maruyama N., Moriuchi J., Wakisaka A., Kimura S., Aizawa M., Itakura K. Evidence for two B-cell alloantigen loci in the HLA-D region, *Immunogenetics*, 9, 336—351 (1979).
60. Kaufman J. F., Andersen R. L., Strominger J. L. HLA-DR antigens have polymorphic light chains and invariant heavy chains as assessed by lysine-containing tryptic peptide analysis, *J. Exp. Med.*, 152, 37s—57s (1980).
61. Kratzin H., Yang C-Y., Gotz H., Pauly E., Kolbel S., Egert G., Thinnies F. P., Wernet P., Altevogt P., Hilschmann N. Primärstruktur menschlicher histokompatibilitätsantigene der Klasse II, 1. Mitteilung: Aminosäuresequenz der N-terminalen 198 Reste der B-Kette des HLA-Dw2,2; DR2,2-alloantigens, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 362, 1655—1669 (1981).
62. Lampson L. A., Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line, *J. Immunol.*, 125, 293—299 (1980).
63. Markert M. L., Cresswell P. Polymorphism of human B-cell alloantigens: evidence for three loci within the HLA-system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6101—6104 (1980).
64. Markert M. L., Cresswell P. Human B cell alloantigens: subunit variability, *J. Immunol.*, 128, 1999—2003 (1982).
65. Markert M. L., Cresswell P. Human B cell alloantigens: Expression of MB and MT determinants, *J. Immunol.*, 128, 2004—2008 (1982).
66. Nadler L. M., Stashenko P., Hardy R., Tomaselli K. J., Yunis E. J., Schlossman S. F., Pesando J. M. Monoclonal antibody identifies a new Ia-like (p29,34) polymorphic system linked to the HLA-D/DR region, *Nature*, 290, 591—593 (1981).
67. Shackelford D. A., Lampson L. A., Strominger J. L. Analysis of HLA-DR antigens by using monoclonal antibodies: recognition of conformation differences in biosynthetic intermediates, *J. Immunol.*, 127, 1403—1410 (1981).
68. Shackelford D. A., Mann D. L., van Rood J. J., Ferrara G. B., Strominger J. L. Human B-cell alloantigens DCl, MTL, and LB12 are identical to each other but distinct from the HLA-DR antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4566—4570 (1981).
69. Shackelford D. A., Strominger J. L. Demonstration of structural polymorphism among HLA-DR light chains by two-dimensional gel electrophoresis, *J. Exp. Med.*, 151, 144—165 (1980).
70. Strominger J. L., Engelhard V. H., Fuks A., Guild B. C., Hyafil F., Kaufman J. F., Korman A. J., Kostyk T. G., Krangel M. S., Lancet D., Lopez de Castro J. A., Mann D. L., Orr H. T., Parham P. R., Parker K. C., Ploegh H. L., Pober J. S., Robb R. J., Shackelford D. A. Biochemical analysis of products of the MHC. In: *The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunology*, ed. by Martin and Dorf. Garland STPM Press, New York, 1981.

71. Tanigaki N., Tosi R., Koyama K., Pressman D. Purification and separation of subsets of human Ia molecules by papain digestion *Immunology*, **39**, 615—618 (1980).
72. Tosi R., Tanigaki N., Centis D., Ferrara G. B., Pressman D. Immunological dissection of human Ia molecules, *J. Exp. Med.*, **148**, 1592—1611 (1978).
73. Korman A. J., Knudsen P. J., Kaufman J. F., Strominger J. L. cDNA clones for the heavy chain of HLA-DR antigens obtained after immunopurification of polysomes by monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1844—1848 (1982).
74. Lee J. S., Trowsdale J., Bodmer W. F. cDNA clones coding for the heavy chain of human HLA-DR antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 545—549 (1982).
75. Larhammar D., Wiman K., Schenning L., Claesson L., Gustafsson K., Peterson P. A., Rask L. Evolutionary relationship between HLA-DR antigen B-chains, HLA-A, B, C antigen subunits and immunoglobulin chains, *Scand. J. Immunol.*, **14**, 617—622 (1981).
76. Brown J. L., Kato K., Silver J., Nathenson S. G. Notable diversity in peptide composition of murine H2-K and H-2D alloantigens, *Biochemistry*, **13**, 3174—3178 (1974).
77. Dayhoff O. Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md, 1972.
78. Wu T. T., Kabat E. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity, *J. Exp. Med.*, **132**, 211—250 (1970).

Роль продуктов генов главного комплекса гистосовместимости в активации Т-лимфоцитов и взаимодействиях клеток

Р. Шварц

(Ronald H. Schwartz)

15.1. Феномен МНС-рестрикции

15.1.1. МНС-рестрикция взаимодействий Т- и В-лимфоцитов

Первые четкие эксперименты, убедительно продемонстрировавшие отсутствие взаимодействий между иммунными лимфоцитами, различающимися по антигенам гистосовместимости, выполнили Кац и др. [5]. В использованной ими экспериментальной модели (рис. 15.1) мышам $F_1(A \times Q)$ вводили в качестве источника Т-лимфоцитов, примированных белком-носителем, клетки селезенки мышей линии А, иммунных к бычьему гамма-глобулину (БГГ). Через 24 ч мышам-реципиентов облучали в дозе 600 рад и затем им вводили (в качестве источника гаптен-специфических В-лимфоцитов) клетки селезенки мышей линии А

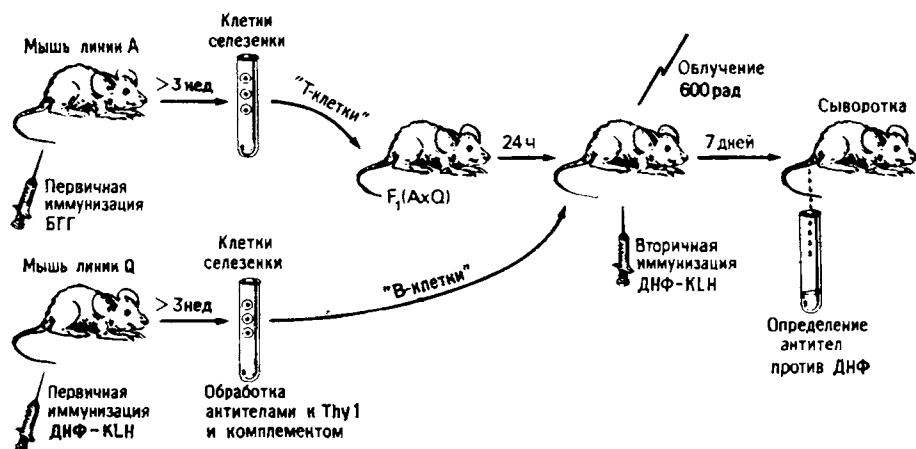


Рис. 15.1. Схема эксперимента, в котором установлено отсутствие взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, различающихся по антигенам гистосовместимости. (По [93]).

или Q, иммунизированных динитрофенилированным гемоцианином моллюска фисуреллии (ДНФ-КЛН). Перед введением клетки обрабатывали антисывороткой против антигена Thy-1 и комплементом. После этого мышам-реципиентов иммунизировали ДНФ-БГГ и через 7 дней определяли титры антител к ДНФ-группе в сыворотке этих животных. Результаты типичного эксперимента приведены в табл. 15.1. Синтез антител против ДНФ наблюдался лишь в том слу-

чае, если использовались Т- и В-лимфоциты одной линии (группы I и II). Однако, если использовались Т-лимфоциты линии А, а В-лимфоциты — линии Q, или наоборот, то антитела против ДНФ либо совсем не образовывались, либо образовывались в незначительном количестве (группы III и IV). Говоря о значимости этих экспериментов, следует особо подчеркнуть воспроизводимость результатов в контрольных группах V и VI (табл. 15.1).

Таблица 15.1. Отсутствие кооперативных взаимодействий *in vivo* Т- и В-лимфоцитов, различающихся по антигенам гистосовместимости¹ (обобщенные данные Каца [5])

Опыт	Группа	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	Анти-ДНФ-антитела, мкг/мл
1	I	A	A	220
	II	Q	Q	120
	III	A	Q	5
	IV	Q	A	15
	V	(A×Q)	(A×Q)	1800
2	VI	A	(A×Q)	1850

¹ Схема опытов показана на рис. 15.1.

В этой части экспериментов ясно показано, что В-лимфоциты $F_1(A \times Q)$ взаимодействуют с Т-лимфоцитами линии А (VI) так же, как и с сингенными Т-лимфоцитами $F_1(A \times Q)$ (V). Этот контроль убедительно свидетельствует о том, что отсутствие кооперации Т-лимфоцитов линии А с В-лимфоцитами линии Q не связано с реакцией на аллоантигены В-лимфоцитов линии Q (т. е. отторжением), так как та же самая реакция должна развиваться в ответ на антигены гистосовместимости линии Q В-лимфоцитов $F_1(A \times Q)$. На этом основании Кац и др. [5] объяснили свои наблюдения отсутствием кооперации различающихся по антигенам гистосовместимости Т- и В-лимфоцитов в ходе антительного ответа.

Было постулировано, что кооперация объясняется наличием молекул клеточного взаимодействия (CI — от англ. cellular interaction) на поверхности двух сингенных клеток. В серии работ по генетическому картированию с использованием резистентных конгенных линий мышей гены, кодирующие молекулы CI, были сначала отнесены к *MHC*-области, а затем к ее I-району [6]. Пример подобного генетического картирования близкородствующих клеток (БОК) приведен в табл. 15.2. В этих экспериментах изучался синтез анти-ДНФ-антител

Таблица 15.2. Продукты генов, кодируемых районом I, определяют *MHC*-рестрикцию хелперных Т-лимфоцитов¹)

Источник В-лимфоцитов	Аллели <i>MHC</i>							Источник Т-лимфоцитов	Аллели <i>MHC</i>							Количество IgG-БОК
	K	I-A	I-J	I-E	I-C	S	D		K	I-A	I-J	I-E	I-C	S	D	
A/J	k	k	k	k	d	d	d	B10.BR	k	k	k	k	k	k	k	1350
A/J	k	k	k	k	d	d	d	A.TL	s	k	k	k	k	k	k	1800
A.TH	s	s	s	s	s	s	d	A.TL	s	k	k	k	k	k	d	100

¹) Буквами обозначен гаплотип аллельного варианта каждой из областей *MHC*. Жирным шрифтом выделены общие аллельные варианты *MHC* доноров Т- и В-лимфоцитов.

методом определения пятен гемолиза после иммунизации ДНФ-KLN. В качестве В-лимфоцитов использовались обработанные анти-Thy-1 и комплементом клетки селезенки мышей, примированных ДНФ-модифицированным экстрактом *Ascaris suum*, а в качестве Т-лимфоцитов — облученные селезеночные клетки мышей, примированных KLN.

Если использовали примированные В-лимфоциты от мышей линии A/J, а примированные Т-лимфоциты — от мышей линии B10.BR, то наблюдалась кооперация этих клеток при генерации анти-ДНФ антител. Эти две линии мышей несут общие аллели области *K*, а также субобластей *I-A*, *I-J* и *I-E* генов *MHC*, но отличаются друг от друга по областям *I-C*, *S* и *D* помимо многих различий по другим локусам вне *MHC*. Следовательно, для эффективного взаимодействия клеток необходимо совпадение аллелей только в левой половине *MHC*.

Если же В-лимфоциты линии A/J добавляли к Т-лимфоцитам линии A.TL, о которой имелись общие аллели только *I-A*, *I-J* и *I-E* субобластей, то взаимодействие клеток также отмечалось. Из этого следует, что для стимуляции ответа достаточна идентичность клеток по области *I* (табл. 15.2). Наконец, если В-лимфоциты линии A.TH использовали в сочетании с Т-лимфоцитами линии A.TL, то кооперации клеток не происходило. Эти две линии различаются только по *I*-и *S*-области *MHC* и небольшому числу локусов, расположенных правее области *D* (ближе к теломере). Рассмотренные данные указывают на то, что гистосовместимость по области *I* необходима для кооперации клеток, а идентичность по прочим локусам, а именно *K* и *D* районам *MHC*, не является обязательной. Дальнейшие работы по картированию показали, что локус, имеющий критическое значение для ответа на ДНФ-KLN, расположен в субобласти *I-A*. В свое время был сделан вывод, что эти эксперименты свидетельствуют об обязательной экспрессии продуктов одной и той же субобласти *I-A* на клетках, вовлеченных в кооперативный иммунный ответ. Подобные структуры могли бы быть идентичными аллельными продуктами одного гена или продуктами тесно сцепленных разных генов субобласти *I-A*. Однако, как будет показано ниже, этот вывод оказался неверным.

15.1.2. MHC-рестрикция взаимодействия Т-лимфоцитов и макрофагов

В опытах Каца (табл. 15.1 и 15.2) использовались неочищенные популяции Т- и В-лимфоцитов и клетки селезенки, либо облученные («Т»), либо обработанные антисывороткой к Thy-1 и комплементом («В»). Эти популяции могли содержать клетки других типов, участвующие в иммунном ответе. В частности, не была полностью исключена активность макрофагов, или антиген-презентирующих клеток, являющихся (Thy-1)-отрицательными и относительно радиорезистентными. Это упущение исправили Розенталь и Шивах [7], показавшие, что взаимодействия макрофагов и Т-лимфоцитов действительно ограничены или рестриктированы продуктами генов *MHC*. Используя различающиеся по *MHC* инбредные линии морских свинок 2 и 13, эти авторы пытались вызвать пролиферацию иммунных Т-лимфоцитов одной линии в ответ на антиген, презентируемый на поверхности макрофагов другой линии. В таких опытах по презентации антигена макрофаги неиммунных животных инкубировали с антигеном в течение 1 ч (нагрузка), отмывали от несвязавшегося антигена, облучали или инкубировали с митомицином С для подавления пролиферации клеток этой популяции. Затем макрофаги добавляли к иммунным Т-лимфоцитам (схема опытов приведена в гл. 5). Полученную смесь клеток культивировали от 72 до 120 ч и пролиферативный ответ Т-лимфоцитов измеряли по включению

в ДНК меченного тритием тимидина. Результаты этих экспериментов показали (табл. 15.3), что индуцированную антигеном пролиферацию Т-лимфоцитов можно получить только при использовании Т-лимфоцитов и макрофагов от животных одной линии (Δ имп./мин — 25 000 для линии 2 и —18 200 для линии 13). При использовании макрофагов от линии, не совпадающей по МНС (например,

Таблица 15.3. Значение макрофагов, сингенных по продуктам МНС, в индукции антигеном синтеза ДНК в иммунных лимфоцитах лимфатических узлов морских свинок (по [7])

Макрофаги		Пролиферация Т-лимфоцитов				СКЛ (Δ имп./мин) 2)	
Линия	Инкубация с антигеном	Т-лимфоциты линии 2		Т-лимфоциты линии 13		13 анти-2	2 анти-13
2	0	900	Δ имп./мин ¹⁾	5700	Δ имп./мин	—	4000
2	+	26 400	25 500	8600	2900		
13	0	4600	Δ имп./мин	1700	Δ имп./мин	3700	—
13	+	3100	0	19 900	18 200		
F ₁ (2 × 13)	0	1900	Δ имп./мин	4300	Δ имп./мин	1000	2600
F ₁ (2 × 13)	+	12 400	10 500	11 800	75 000		

1) Δ имп./мин — антиген-специфический ответ, определяемый как разность между стимуляцией Т-клеток нагруженными антигеном макрофагами и стимуляцией Т-клеток макрофагами, не нагруженными антигеном.

2) Реакция смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) определяется как разность в стимуляции Т-лимфоцитов аллогенными и сингенными макрофагами в отсутствие антигена.

Т-лимфоциты линии 2 и макрофаги линии 13), антиген-специфическая пролиферация либо совсем не наблюдалась, либо лишь незначительно превышала контрольный уровень включения, когда использовали макрофаги, не нагруженные антигеном (Δ имп./мин < 0). Следует отметить, что контрольный уровень включения в комбинации аллогенных клеток значительно выше, чем в случае сингенных клеток: например, при сочетании Т-лимфоцитов линии 13 и макрофагов линии 2 включение достигает 5700 имп./мин, тогда как при комбинации Т-лимфоцитов и макрофагов линии 13 — только 1700 имп./мин. Разница в 4000 имп./мин обусловлена пролиферативным ответом смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), наблюдающимся при объединении аллогенных лейкоцитов. В пользу предположения, что низкий уровень антиген-специфической пролиферации в комбинации аллогенных клеток не связан с аллореактивностью, свидетельствуют опыты с использованием гибридов F₁. Макрофаги гибридов F₁ (2 × 13) были способны презентировать антиген Т-лимфоцитам линии 2 (Δ имп./мин — 10 500) или линии 13 (Δ имп./мин — 7500), хотя и вызывали реакцию СКЛ (см. табл. 15.3, где ответ в СКЛ Т-лимфоцитов линии 13 анти-F₁ составлял 1000 имп./мин, а в СКЛ линии 2 анти-F₁ — 2600 имп./мин). На основании этих экспериментов Розенталь и Шивах [7] сделали вывод о необходимости совпадения аллельных вариантов МНС макрофага и Т-лимфоцита для эффективного взаимодействия этих клеток при индукции пролиферативного ответа. Эти исходные данные, полученные в опытах на морских свинках, были подтверждены и расширены исследованиями на мышах, генетика которых изучена более детально, что позволило картировать в I-A-субобласти МНС гены, рестрикрующие пролиферативный ответ на такие антигены, как ДНФ-овальбумин [8].

В последующих опытах по индукции хелперных Т-лимфоцитов антигеном и макрофагами *in vitro* Эрб и Фельдман (Erb, Feldman) выявили сходную генетическую рестрикцию продуктами генов субобласти I-A. Кроме того, в иссле-

дованиях гиперчувствительности замедленного типа, проведенных Миллером (Miller) и сотрудниками, было установлено, что для переноса этого опосредованного Т-лимфоцитами феномена *in vivo* также необходимо совпадение части локусов *МНС* у донора и реципиента. Считается, что это связано с участием АПК (клеток Лангерганса кожи) реципиента в рестимуляции Т-лимфоцитов в месте введения антигена. Таким образом, для стимуляции всех форм иммунного ответа, в которые вовлечены индукторные Т-лимфоциты (гл. 4), по-видимому, необходима презентация антигена макрофагами. Эти клеточные взаимодействия рестриктированы продуктами генов *I*-области *МНС*.

С учетом того, что *МНС*-рестрикция действует на уровне взаимодействий между макрофагами и Т-клетками, следует пересмотреть исходные работы по антителообразованию и выяснить, является ли взаимодействие Т- и В-лимфоцитов также *МНС*-рестриктированным. Отношение к этому вопросу среди исследователей, занимающихся клеточной иммунологией, в течение многих лет оставалось противоречивым, и полученный в конце концов ответ оказался, как это часто бывает, ответом «и да, и нет» в зависимости от конкретных деталей используемой системы определения. Мы еще вернемся к более детальному обсуждению этой проблемы после того, как рассмотрим все основные исследования в области *МНС*-рестрикции.

15.1.3. *МНС*-рестрикция взаимодействия цитотоксических Т-лимфоцитов и клеток-мишеней

Последней по времени открытия, но не по значению, системой иммунного ответа, в которой был обнаружен феномен *МНС*-рестрикции, стало взаимодействие несущих антиген клеток-мишеней и цитотоксических Т-лимфоцитов, так называемых Т-киллеров (гл. 25). Это независимо показали Цинкернагель и Догерти [9] на инфицированных вирусом клетках-мишенях и Ширер и др. на тринитрофенилированных (ТНФ) сингенных клетках [10]. Результаты экспериментов с клетками, модифицированными вирусом, приведены в табл. 15.4 (детали цитотоксического теста см. в гл. 25). Мышей линий А или Q заражали живым вирусом лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) и через 7 дней исследовали способность клеток селезенки этих животных убивать (вызывать выход ^{51}Cr) меченные ^{51}Cr инфицированные вирусом перитонеальные макрофаги линий

Таблица 15.4. Генетическая рестрикция цитотоксического действия Т-лимфоцитов *in vitro*, направленного против инфицированных вирусом клеток-мишеней по ([9])

Источник клеток селезенки		Источник макрофагов	Выход ^{51}Cr из макрофагов, % ¹⁾	
Линия	Иммунный статус		инфицированные	неинфицированные
A	Нормальные	A	49,6 ± 2,5	43,5 ± 1,6
A	Иммунные	A	77,5 ± 4,2	47,0 ± 3,5
A	»	Q	44,0 ± 2,9	41,0 ± 2,4
Q	Нормальные	Q	46,5 ± 3,6	44,4 ± 6,2
Q	Иммунные	Q	72,5 ± 5,2	40,0 ± 2,9
Q	»	A	32,9 ± 3,0	48,0 ± 3,9

¹⁾ Выход ^{51}Cr представлен как процент от максимального выхода при лизисе клеток дистиллированной водой. Значения, выделенные курсивом, статистически достоверно превышают процент выхода ^{51}Cr из инфицированных мишеней под действием иммунных Т-лимфоцитов.

А и Q. Неиммунизированные клетки селезенки служили контролем на спонтанный выход ^{51}Cr . Иммунные клетки селезенки мышей линии А убивали зараженные вирусом макрофаги линии А, но не линии Q, а иммунные клетки селезенки линии Q убивали инфицированные макрофаги мышей линии Q, но не линии А (табл. 15.4). Экспрессия вирусных антигенов необходима для лизиса клеток-мишеней, так как выход ^{51}Cr из неинфицированных макрофагов в ответ на иммунные и неиммунные клетки селезенки оказался сравнимым. Следовательно, для цитотоксического эффекта необходимы и антиген, и сингенные клетки-мишени. Сходные наблюдения были сделаны и в ряде исследований ответа цитотоксических Т-лимфоцитов на другие вирусы, а также при изучении Т-киллеров, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости, таким, как антиген самцов Н-У.

В отличие от хелперных и пролиферирующих Т-лимфоцитов, взаимодействия которых рестриктированы продуктами генов *I*-области *MHC* (молекулами класса II), цитотоксическое действие Т-киллеров оказалось рестриктированным по продуктам генов *K*- и *D*-областей *MHC* (молекулами класса I). Пример генетического картирования рестрикции при ответе на ТНФ-модифицированные сингенные клетки представлен в табл. 15.5. Клетки селезенки мышей В10.D2

Таблица 15.5. Цитотоксическое действие Т-лимфоцитов рестриктировано *MHC*-молекулами класса I (по [10])

Отвечающие Т-лимфоциты мышей линии	Клетки-мишени линии	Аллели <i>MHC</i> ¹⁾							Специфический лизис $\pm M$, % ²⁾
		<i>K</i>	<i>I-A</i>	<i>I-J</i>	<i>I-E</i>	<i>I-C</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	
В10.D2	В10. D2	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$-2,4 \pm 2,8$
	ТНФ-В10.D2	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$\bar{d}$	$19,2 \pm 2,4$
	ТНФ-В10.BR	$\bar{k}$	$\bar{k}$	$\bar{k}$	$\bar{k}$	$\bar{k}$	$\bar{k}$	$\bar{k}$	$2,4 \pm 0,6$
	ТНФ-А.TL	s	k	k	k	k	k	$\bar{d}$	$15,6 \pm 3,7$

1) Буквы обозначают гаплотип аллельных вариантов каждой области и субобласти *MHC*.

Черточкой под буквой выделены общие аллельные варианты доноров цитотоксических Т-лимфоцитов и клеток-мишеней.

2) Процент специфического лизиса является другим способом выражения выхода ^{51}Cr по сравнению с представленным в таблице 15.4. В этом случае значения выхода ^{51}Cr из мишеней, инкубированных с нормальными неиммунными клетками селезенки (контроль), вычитают из значений выхода изотопы из мишеней, инкубированных с иммунными клетками селезенки. Полученную разность делят на максимальное значение выхода ^{51}Cr из клеток-мишеней после замораживания и оттаивания и полученный результат умножают на 100.

стимулировали сингенными облученными клетками, которые химически модифицировали 10 mM тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНФ-В10.D2). Отвечающие клетки вызывали лизис модифицированных ТНФ-В10.D2-клеток селезенки, но не лизировали немодифицированные В10.D2-клетки селезенки, что свидетельствует о необходимости химической модификации клетки для формирования чужеродного антигена. Отвечающие клетки не лизировали ТНФ-модифицированные клетки В10.BR селезенки мышей, отличавшиеся от клеток В10.D2 только по *MHC*. Однако цитотоксические Т-лимфоциты лизировали ТНФ-клетки-мишени линии А.TL, несущие аллель «*d*» *D*-области комплекса *H-2*. В целом полученные результаты указывают, что экспрессия продукта гена *D^d* клетками-мишенями — условие, необходимое для их лизиса. Последующие работы ряда исследователей показали, что каждая молекула класса I (*K*, *D* и *L*) может служить рестриктирующим элементом для цитотоксических Т-лимфоцитов.

Хотя цитотоксический иммунный ответ Т-лимфоцитов представляет собой сложную иммунологическую реакцию, в которой участвуют Т-хелперы, предшественники Т-киллеров и одна или более АПК, такая система оказалась наиболее подходящей моделью для изучения сложных вопросов МНС-рестрикции. Прежде всего это связано с прямым анализом специфичности эффекторных Т-лимфоцитов в тесте с коротким временем культивирования (4—16 ч). В этом случае не возникает вопроса о возможных аллогенных эффектах, которые могут давать ложно-отрицательные результаты, так как лизируемые клетки-мишени (инфицированные вирусом или ТНФ-модифицированные опухолевые клетки) не вызывают реакции СКЛ, поскольку эти клетки не экспрессируют молекулы класса II. Таким образом, если при изучении хелперных и пролиферативных систем было неясно, исключают ли контроли с использованием гибридов F_1 возможные аллогенные эффекты, то исследователи, изучавшие цитотоксические системы иммунного ответа, пришли к выводу, что МНС-рестрикция является общей особенностью распознавания антигенов всеми Т-лимфоцитами. Они продолжили исследования, поставив эксперименты с популяцией отвечающих клеток гибридов F_1 , что явилось следующей важной вехой в истории развития клеточной иммунологии.

15.2. Субпопуляции клеток гибридов F_1 , специфичные к одному антигену и разным молекулам МНС

15.2.1. Модель сближения или взаимодействия подобных структур против модели измененного «своего» или новой антигенной детерминанты

Факт существования феномена МНС-рестрикции стал очевиден в 1974 г. Для иммунного ответа Т-лимфоцитов оказалось необходимым не только распознавание антигена, но и идентичность взаимодействующих клеток (макрофаг/Т-лимфоцит; Т-хелпер/В-лимфоцит; цитотоксический Т-лимфоцит/мишень) по определенным МНС-продуктам. Однако интерпретация этих фактов была далеко не ясна. Модель клеточных взаимодействий предполагала существование независимой распознающей системы для коммуникации клеток, которая обсуждалась в основном как взаимодействие подобных структур. При этом предполагалось, что одни и те же молекулы МНС на поверхности двух взаимодействующих клеток физически взаимодействуют по типу формирования димеров или тетрамеров ферментов. Антиген-специфический рецептор Т-лимфоцитов представляет вторую распознающую структуру клеточной поверхности, которая определяет клональный ответ (т. е. антигенную специфичность). Для индукции ответа Т-лимфоцитов оба вида молекулярных взаимодействий должны осуществляться одновременно. В литературе по цитотоксическим Т-лимфоцитам эта модель получила название модели сближения и постулировала необходимость тесной ассоциации Т-клетки и мишени для эффективного лизиса, возможно, в связи с участием молекул МНС класса I в механизме лизиса клетки-мишени.

Впервые эта концепция была поставлена под сомнение исследователями, изучавшими индуцированные вирусом цитотоксические Т-лимфоциты. Цинкернагель и Догерти [11] предположили, что «антиген-специфический» Т-клеточный рецептор специфичен, вероятно, не к антигену (вирусному белку на мембране клетки-мишени), а к модифицированной молекуле МНС, индуцированной ви-

русными белками в процессе репликации вируса. Эта точка зрения стала известна как *модель измененного своего*. Пиларский (Pilarski), однако, высказал предположение, что молекула МНС и вирусный мембранный белок способны при взаимодействии образовывать комплекс, который распознается Т-клеткой как единая чужеродная структура. Такой комплекс получил впоследствии название *новой антигенной детерминанты* (НАД) или *комплексной антигенной детерминанты* (КАД). То новое, что внесли эти идеи в литературу, заключалось в истолковании МНС-рестрикции как необходимости одновременного распознавания антигена и молекулы МНС интегрированным Т-клеточным рецептором со специфичностью к этим двум структурам (или измененной форме молекулы МНС). Таким образом, в отличие от моделей клеточных взаимодействий, согласно последней модели, МНС не кодирует часть рецепторной молекулы (или молекул, участвующих в распознавании МНС детерминант). Так, наличие рецептора с иммуноглобулинподобной вариабельной областью, сходного с рецепторами В-лимфоцитов и обладающего специфичностью к комплексной детерминанте из вируса и молекулы МНС, оказывается достаточным для объяснения МНС-рестриктированных взаимодействий.

15.2.2. Цитотоксические Т-лимфоциты $F_1(A \times Q)$, стимулированные вирусом у облученных животных линии А, но не линии Q, лизируют инфицированные вирусом мишени линии А

С тем чтобы проверить правомочность рассмотренных выше теорий, Цинкернагель и Догерти [11] поставили эксперименты, которые, по их мнению, позволили бы сделать выбор между моделями сближения или взаимодействий подобных структур и измененного «своего» или НАД. В первом эксперименте с использованием гибридов $F_1(A \times Q)$, иммунизированных вирусом ЛХМ, отбиралась популяция цитотоксических Т-лимфоцитов, которые убивали инфицированные вирусом опухолевые клетки-мишени как линии А, так и линии Q, хотя эти же Т-клетки не убивали инфицированные вирусом опухолевые мишени животных третьей линии, несовместимой по МНС, например Z. Таким образом, Т-лимфоциты распознают вирус ЛХМ в ассоциации с молекулами МНС линии А и (или) Q. По мнению этих авторов, согласно модели сближения, Т-лимфоцит гибрида F_1 должен иметь рецептор для вируса и кодируемые МНС-молекулы клеточных взаимодействий каждой из родительских линий, так как для продуктов МНС характерна кодоминантная экспрессия у гибридов F_1 . Иными словами, все клетки $F_1(A \times Q)$ экспрессируют антигены гистосовместимости линий А и Q. В таком случае одна Т-клетка должна лизировать клетки-мишени обеих родительских линий. В случае модели НАД, наоборот, каждая комбинация антигена и МНС молекулы является уникальной. Поэтому для объяснения данных экспериментов с гибридами F_1 необходимо предположить существование по крайней мере двух независимых клонов Т-лимфоцитов, один из которых специфичен к комплексу ЛХМ и МНС-молекуле линии А, а другой — ЛХМ и МНС-молекуле линии Q.

Для выбора между этими двумя моделями были проведены следующие эксперименты. Клетки селезенки мышей $F_1(A \times Q)$, иммунизированных вирусом ЛХМ, вводили внутривенно летально облученным реципиентам родительских линий, инфицированным вирусом. По всей вероятности, в этих условиях Т-клетки реципиента инактивируются облучением и перенесенные Т-клетки F_1 рестимулируются клетками, инфицированными вирусом, несущими МНС-молекулы реципиента (МНС-А). Спустя семь дней определяли цитотоксическую активность Т-клеток селезенки таких мышей против инфицированных вирусом

Таблица 15.6. Цитотоксические Т-лимфоциты $F_1 (A \times Q)$, стимулированные вирусом в облученном реципиенте родительской линии А, но не линии Q, лизируют инфицированные вирусом клетки-мишени родительской линии А (по [11])

Источник клеток, иммунных к вирусу	Облученный реципиент	Выход ^{51}Cr из клеток-мишеней линии А, % ¹⁾	
		инфицированные	неинфицированные
$F_1 (A \times Q)$	А	$83,7 \pm 5,4$	$19,0 \pm 1,4$
$F_1 (A \times Q)$	Q	$23,3 \pm 1,3$	$19,1 \pm 1,0$

¹⁾ Определение выхода ^{51}Cr и выделенные курсивом значения описаны в табл. 15.4.

опухолевых клеток, несущих молекулы МНС линии А. Как показано в табл. 15.6, если иммунные Т-лимфоциты мышей $F_1 (A \times Q)$ вторично стимулируют в облученном реципиенте линии А, то генерируются цитотоксические Т-клетки, специфичные к вирусу ЛХМ в ассоциации с МНС-молекулами линии А. В отличие от этого если Т-клетки F_1 вторично стимулировали в реципиенте линии Q, то генерации цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к вирусу ЛХМ и молекулам МНС линии А, не наблюдалось. Этот дефект не может быть негативным следствием аллореактивности (например, отторжения) Т-клеток реципиента линии Q на антигены гистосовместимости линии А, экспрессированные на клетках донора F_1 , так как Т-клетки реципиента инактивировали облучением и, что более важно, клетки F_1 нормально функционировали при введении реципиенту линии Q. Если бы дело заключалось в аллореактивности, то ввиду способности Т-клеток линии А распознавать антигены гистосовместимости линии Q реципиент линии А должен был бы отторгать клетки F_1 . Таким образом, оказывается, что популяция Т-клеток гибридов F_1 характеризуется двумя независимыми специфичностями, одной — к вирусу ЛХМ и МНС-А-молекуле, которая селектируется в реципиенте линии А, но не линии Q, и другой, специфичной к вирусу ЛХМ и МНС-Q-молекулам, которая селектируется в реципиенте линии Q, но не А.

Эти эксперименты противоречат гипотезе существования одной вирус-специфической популяции Т-клеток, обладающей кодоминантно экспрессированными молекулами клеточных взаимодействий. В этом случае рестимуляция клеток вирусом в реципиенте линии Q должна была бы вызывать появление Т-лимфоцитов, способных лизировать и модифицированные вирусом мишени линии А. Все же модель взаимодействия подобных структур не опровергается, если постулировать аллельное исключение этих молекул в Т-лимфоцитах, т. е. если каждая Т-клетка гибрида F_1 экспрессирует молекулы клеточных взаимодействий только одного из родителей. Следует отметить, что аллельное исключение этих структур не может происходить в клетках-мишенях, так как цитотоксические Т-лимфоциты обоих родителей способны лизировать одни и те же F_1 -мишени.

15.2.3. Молекулы класса I являются элементами рестрикции, распознаваемыми цитотоксическими Т-лимфоцитами

Эксперименты по комплементзависимой цитотоксичности и иммунофлуоресценции с использованием антисывороток против Н-2 показали, что аллельное исключение молекул Н-2К и D не происходит в Т-клетках гибридов F_1 . Следо-

вательно, в рамках модели взаимодействия подобных структур (СІ) молекулы Н-2К и D не могут быть теми молекулами, которые обеспечивают клеточное взаимодействие. Тогда молекулы СІ должны кодироваться тесно сцепленными генами, что вполне возможно, поскольку исходное генетическое картирование проводилось на рекомбинантных мышах. С помощью таких рекомбинантов можно установить только область определенной хромосомы. Очевидно, что в каждой области и субобласти может находиться несколько генов. Следовательно, для идентификации молекул МНС, распознаваемых цитотоксическими Т-лимфоцитами, требовались другие подходы.

Первый подход сводится к использованию антисывороток против молекул К и D для подавления опосредованной Т-лимфоцитами цитотоксичности. Результаты подобного опыта приведены в табл. 15.7. Хотя эти данные убедительно

Таблица 15.7. Подавление функциональной активности вирус-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов анти-Н-2-аллоантисывороткой ¹⁾ по [121]

Т-лимфоциты	Сыворотка	Выход ⁵¹ Cr, %	Подавление активности Т-лимфоцитов
1 Нормальные Н-2 ^k	Нет	18 ± 0,4	Нет
2 Нет	Нормальная	17,7 ± 0,8	
3 Иммунные Н-2 ^k	»	43,7 ± 1,2	
4 Нет	Анти-Н-2К ^k	18,2 ± 1,0	Да
5 Иммунные Н-2 ^k	»	16,7 ± 0,8	
6 Нет	Анти-Н-2К ^d	16,6 ± 1,7	Нет
7 Иммунные Н-2 ^k	»	53,2 ± 2,1	

¹⁾ Мышей СЗН (Н-2^k) инфицировали вирусом осповакцины и определяли цитотоксическую активность их клеток селезенки на фибробластах L929 (Н-2^k), инфицированных вирусом. Лизис блокировался антисывороткой от F₁ (СЗН. ОН×129) анти-СЗН, содержащей антитела против молекул К^k (5-я строка), но не нормальной мышинной сывороткой (3-я строка), или антисывороткой от F₁ (В10×А) анти-В10.Д2, которая содержит антитела против молекул К^d (7-я строка).

свидетельствуют о том, что распознавание молекул К и D — условие, необходимое для функционирования цитотоксических Т-лимфоцитов, для окончательного вывода они все же недостаточны. Одна проблема состоит в том, что антисыворотки к продуктам К- и D-областей получены с использованием тех же рекомбинантных линий мышей, о которых говорилось выше. Поливалентная антисыворотка могла содержать антитела к продуктам нескольких генов, кодируемых одной и той же областью. Это возражение в настоящее время снято в результате использования моноклональных антител против Н-2К и D. Однако вторая проблема в интерпретации опытов по подавлению цитотоксичности не была решена. Так, не исключена возможность, что молекулы Н-2К и D тесно ассоциированы на поверхности клетки с генетически и структурно различными молекулами клеточных взаимодействий и что последние стерически экранируются антителами, направленными против Н-2К и D.

При изучении линий мышей с Н-2К^b-мутациями были поставлены более четкие эксперименты для определения продукта гена Н-2К как рестриктивного элемента, т. е. закодированного в МНС гликопротеина, который распознают цитотоксические Т-лимфоциты в сочетании с антигеном. Структурные исследования молекулы К^b свидетельствуют о том, что мутации привели

к заменам от одного до трех аминокислотных остатков (гл. 14). Используя две такие мутантные линии, Н-2^{bm1} и Н-2^{bm6}, Цинкернагель [13] показал, что цитотоксические Т-лимфоциты, полученные к вирусу осповакцины или вирусу ЛХМ у мышей Н-2К^b, не лизируют инфицированные вирусом клетки-мишени мутантных мышей (табл. 15.8), и наоборот. Следовательно, сама молекула К^b, по-видимому, является рестриктирующим элементом, поскольку вариации ее структуры могут менять специфичность индуцируемых цитотоксических Т-лимфоцитов и природу распознаваемой антигенной молекулы.

Таблица 15.8. Определение молекул К^b как рестриктирующего элемента с помощью мутантов Н-2¹) (по [13])

Макрофагальные мишени	Н-2		Выход ⁵¹ Cr из клеток-мишеней, %	
	К	D	неинфицированные	инфицированные
B10.A (5R)	b	d	27,6	60,2
C57BL/10	b	b	18,9	62,7
bm1	ba	b	29,6	27,1
bm6	bf	b	25,0	32,9
B10.A (2R)	k	b	23,6	22,7

¹) Мышей B10.A (5R), несущих нормальную молекулу К^b, инфицировали вирусом осповакцины и затем определяли цитотоксическую активность клеток селезенки против меченных ⁵¹Cr макрофагов различных линий. Выход ⁵¹Cr из клеток сингенных мишеней B10.A (5R), инфицированных вирусом, был достоверно выше, чем из неинфицированных мишеней. C57BL/10 мишени, также несущие молекулу К^b, лизировались с одинаковой эффективностью. В отличие от этого инфицированные вирусом мишени bm1 и bm2, экспрессирующие мутантные молекулы К^b, не лизировались, как и аллогенные мишени B10.A (2R), которые экспрессируют другой аллельный продукт области К-К^k.

В последнее время для окончательного подтверждения роли молекул класса I как рестриктирующих элементов используются молекулярно-биологические методы клонирования и трансфекции генов. Так, например, инфицированные вирусом везикулярного стоматита (ВВС) L-клетки мышей (Н-2К^b), в которые был трансфецирован геномный клон, содержащий ген Н-2L^d, служили мишенями для ВВС-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов мышей двух различных линий с гаплотипом Н-2^d. Этот цитотоксический эффект специфически подавляется моноклональными антителами против молекул Н-2L^d, но не моноклональными антителами против молекул Н-2D^d. Т-лимфоциты не лизировали ложно трансформированные клетки, которые не экспрессируют продукт гена Н-2L^d. Этими экспериментами Форман и др. [14] продемонстрировали отчетливо, что для осуществления литической функции цитотоксических Т-лимфоцитов на клетках-мишенях должен быть экспрессирован продукт именно гена Н-2L^d в дополнение к антигенам вируса везикулярного стоматита.

Эксперименты с использованием мутантов и переносом генов показали, что молекулы класса I являются рестриктирующими элементами, распознаваемыми цитотоксическими Т-лимфоцитами. Учитывая это, можно теперь вернуться к экспериментам по положительной селекции клеток F₁, описанным в табл. 15.6, и убедиться, что результаты этих опытов нельзя объяснить аллельным исключением структур клеточных взаимодействий. Это связано с тем, что такими структурами клеток-мишеней являются молекулы МНС класса I, аллельные варианты которых кодоминантно экспрессированы на отвечающей

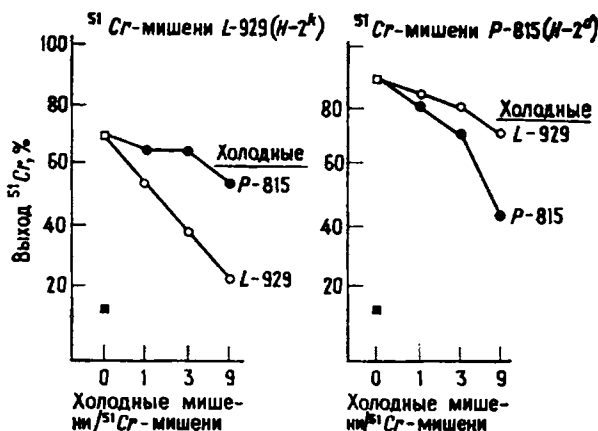
популяции Т-лимфоцитов гибридов F_1 . Следовательно, наиболее вероятная интерпретация этих результатов заключается в существовании в популяции отвечающих клеток F_1 двух независимых субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов, каждая из которых специфична к вирусу в ассоциации с молекулами МНС одного из родителей.

15.2.4. Исследования торможения холодными мишенями

В дополнение к экспериментам по положительной селекции Цинкернагель и Догерти [15] выявили независимые популяции Т-лимфоцитов у гибридов F_1 в опытах по конкурентному торможению холодными мишенями (методические подробности см. в гл. 25). При этом клетки-мишени, не меченные ^{51}Cr , в избытке добавляются в ходе определения цитотоксического действия. Они конкурируют с мечеными ^{51}Cr мишенями за связывание со специфическими Т-лимфоцитами.

Рис. 15.2. Конкурентное торможение выхода ^{51}Cr из инфицированных вирусом ЛХМ, меченных L-929 (А) и Р-815 (Б) мишеней в ответ на 7-дневные иммунные цитотоксические Т-клетки мышей F_1 (CBA/H $\times$ BALB/c) ($H-2^k \times H-2^d$) разными дозами немеченых (холодных) инфицированных вирусом ЛХМ опухолевых клеток Р-815 ($H-2^d$) (темные кружки) или L-929 ($H-2^k$) (светлые кружки).

Светлым квадратом показан уровень лизиса опухолевых клеток в отсутствие холодных мишеней, темным квадратом — уровень спонтанного выхода ^{51}Cr в отсутствие цитотоксических Т-клеток [15].



Поскольку такое торможение имеет прямое отношение к специфичности популяции Т-лимфоцитов, оно позволяет различать смешанные популяции Т-клеток с разной специфичностью. Пример использования этого подхода при анализе субпопуляций клеток F_1 представлен на рис. 15.2. Цитотоксическую активность клеток селезенки мышей F_1 (CBA/H $\times$ BALB/c) ($H-2^k \times H-2^d$), инфицированных вирусом ЛХМ, определяли на меченных ^{51}Cr , инфицированных вирусом опухолевых клетках-мишенях каждой из родительских линий. Лизис клеток-мишеней опухоли L-929 ($H-2^k$) ингибировали инфицированные вирусом немеченые клетки L-929, тогда как инфицированные вирусом немеченые опухолевые клетки P-815 ($H-2^d$) не вызывали заметного торможения. Это означает, что Т-лимфоциты, цитотоксичные по отношению к вирусу ЛХМ в ассоциации с молекулами $H-2^k$, не распознают (и не связываются) мишени, несущие вирус ЛХМ и молекулы $H-2^d$. При определении цитотоксичности той же самой популяции иммунных клеток F_1 на меченных ^{51}Cr , инфицированных вирусом ЛХМ мишенях P-815, наоборот, только инфицированные вирусом холодные мишени P-815, но не L-929 оказывали ингибирующее действие. Таким образом, популяция клеток F_1 состоит из двух неперекрестно-реагирующих субпопуляций, одна из которых специфична к вирусу ЛХМ в ассоциации с молекулами $H-2^d$, а другая специфична к вирусу ЛХМ в ассоциации с молекулами $H-2^k$.

Продолжение подобных экспериментов на рекомбинантных по $H-2$ линиях мышей позволило выявить другое разделение специфичности цитотоксических Т-лимфоцитов. Считается, что мыши линии A/J (K^k , $I-A^k$, $I-J^k$, $I-E^k$, $I-C^d$,

S^d , D^d) обладают естественным рекомбинантным гаплотипом *МНС*. Левая половина *МНС* этих мышей происходит от мышей с гаплотипом $H-2^k$, а правая — от мышей с гаплотипом $H-2^d$. Если таких мышей иммунизировали вирусом ЛХМ и через семь дней определяли цитотоксическую активность клеток селезенки, то полученные Т-лимфоциты лизировали модифицированные вирусом опухолевые мишени, как $H-2^k$ (L-929)-, так и $H-2^d$ (P-815)-гаплотипа. Опыты по холодному конкурентному торможению показали, что лизис меченных ^{51}Cr клеток L-929, инфицированных вирусом, может быть подавлен немечеными инфицированными вирусом клетками L-929 ($H-2^k$), но не инфицированными вирусом немечеными клетками P-815 ($H-2^d$). Лизис меченных ^{51}Cr клеток P-815, инфицированных вирусом, подавлялся немечеными инфицированными вирусом клетками P-815, но не инфицированными вирусом клетками L-929. Эти результаты доказывают, что специфичные к вирусу ЛХМ цитотоксические клетки мышей состоят из двух независимых популяций: одной, специфичной к вирусу ЛХМ в ассоциации с молекулами $H-2^k$ (по-видимому, K^k), и другой, специфичной к вирусу ЛХМ в ассоциации с молекулами $H-2^d$ (по-видимому, L^d или D^d).

В общем, эксперименты, выполненные Цинкернагелем и Догерти [15], свидетельствуют о том, что у мышей $F_1(A \times Q)$ могут быть получены четыре различные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к одному и тому же вирусу (V): одна, распознающая V и K^a , вторая — V и K^q , третья — V и D^a и четвертая — V и D^q . Эти наблюдения наилучшим образом согласуются с гипотезой существования на Т-лимфоцитах распознающей структуры, специфичной к собственным молекулам *МНС* и характеризующейся клональным распределением. Иными словами, каждая из молекул *МНС* распознается уникальным рецептором.

15.2.5. Выявление независимых популяций

Т-лимфоцитов гибридов F_1 , специфичных к одному антигену в ассоциации с молекулами *МНС* класса II родительских линий

15.2.5.1. Пролиферирующие Т-лимфоциты

В 1976 г. представления о субпопуляциях клеток F_1 были распространены и на Т-лимфоциты, рестриктированные по I-области. Наиболее полное исследование пролиферирующих Т-лимфоцитов с использованием положительной и отрицательной селекции для выявления двух субпопуляций осуществили Пол и др. [16]. Гибриды морских свинок $F_1(2 \times 13)$ иммунизировали овалбумином (ОА) в полном адьюванте Фрейнда, выделяли Т-лимфоциты перитонеального эксудата и стимулировали их *in vitro* нагруженными ОА макрофагами линии 2 или линии 13. Спустя неделю, клетки собирали, отмывали и вновь стимулировали нагруженными ОА макрофагами родительских линий. Еще через 4 дня определяли включение ^3H -тимидина для количественной оценки индуцированного антигеном пролиферативного ответа. Как видно из табл. 15.9, неселективированные Т-лимфоциты перитонеального эксудата гибрида F_1 хорошо отвечают на нагруженные ОА макрофаги как линии 2, так и линии 13. Однако, если в первичной культуре лимфоциты стимулируют ОА на макрофагах линии 2, рестимуляция нагруженными ОА макрофагами линии 2 вызывает выраженный ответ, а стимуляция нагруженными ОА макрофагами линии 13 не дает значимого ответа. Стимуляция при первом культивировании ОА на макрофагах линии 13, наоборот, вызывает сильный ответ на нагруженные ОА макрофаги линии 13 и значительно более слабый — на нагруженные ОА макрофаги ли-

Таблица 15.9. Положительная селекция Т-лимфоцитов гибридов нагруженными антигеном макрофагами родительских линий (по [16])

Т клетки F ₁ ¹⁾	МФ, использо- ванные для рестимуляции	Пролиферация, имп./мин ($\times 10^{-3}$)	
		Ненагруженные антигеном	Нагруженные ОА
Неселектированные	2	2,5	44,5
	13	3,9	52,3
Селектированные на ОА-нагру- женных МФ линии 2	2	0,8	85,3
	13	1,0	1,8
Селектированные на ОА-нагру- женных МФ линии 13	2	0,9	23,4
	13	2,7	83,3

¹⁾ Т-лимфоциты получали фракционированием на колонках с синтетической ватой клеток перитонеального экссудата F₁ (2 $\times$ 13) морских свинок, иммунизированных овалбумином (ОА) в полном адьюванте Фрейнда. Способность к ответу некоторых клеток определяли непосредственно (неселектированные), тогда как другие в течение недели до рестимуляции культивировали с нагруженными ОА макрофагами (МФ) линии 2 или 13.

нии 2. Эти данные указывают на возможность избирательного обогащения субпопуляции Т-клеток, специфичной к антигену в ассоциации с макрофагами одной из родительских линий.

В опытах по отрицательной селекции Т-лимфоциты гибридов F₁ также стимулировали нагруженными ОА макрофагами линии 2 или 13, но на этот раз через 2 дня в культуры добавляли 2-бромдезоксисуридин (БУДР). Клетки инкубировали еще в течение 24 ч, чтобы этот аналог тимидина включился в ДНК отвечающих клеток. Затем культуры выдерживали на свету, что приводило к активации БУДР, перекрестной сшивке ДНК, подавлению репликации и гибели клеток. Выжившие клетки отмывали от БУДР и повторно культивировали с нагруженными антигеном макрофагами каждой из родительских линий. После дополнительного культивирования в течение четырех дней ответ определяли

Таблица 15.10. Отрицательная селекция Т-лимфоцитов гибридов F₁, нагруженными антигеном макрофагами родительских линий ¹⁾ (по [16])

ОА-нагруженные МФ в первичной культуре	Антиген	Пролиферация во вторичной культу- ре на МФ, имп./мин ($\times 10^{-3}$) ¹⁾	
		Линия 2	Линия 13
Линия 2	Нет	1,0	4,9
	ОА	1,9	25,4
	PPD	86,8	55,9
Линия 13	Нет	26,8	2,4
	ОА	102,7	4,5
	PPD	95,3	67,7

¹⁾ Т-лимфоциты морских свинок F₁ (2 $\times$ 13), иммунизированных ОА и PPD, культивировали в течение 2 дней с нагруженными ОА макрофагами (МФ) линии 2 или 13, после чего добавляли бромдезоксисуридин. После дополнительного культивирования в течение 24 ч, клетки 90 мин. выдерживали на свету, отмывали и повторно культивировали с макрофагами F₁ линий 2 или 13, нагруженными ОА, PPD или ненагруженными (вторичная культура). Включение ³H-тимидина определяли через 3 дня (имп./мин). Курсивом выделено включение при специфической отрицательной селекции.

по включению ^3H -тимидина. Как следует из табл. 15.10, если Т-клетки гибридов F_1 стимулировали нагруженными ОА макрофагами линии 2 до и после освещения и обработки БУДР, во вторичной культуре не наблюдалось пролиферативного ответа. Это свидетельствует об удалении всех Т-клеток, специфичных к ОА в ассоциации с макрофагами линии 2. Если же во вторичной культуре использовались макрофаги линии 13, то наблюдался выраженный ответ на тот же самый антиген ОА. Следовательно, должна существовать вторая популяция Т-лимфоцитов гибридов F_1 , специфичная к ОА в ассоциации с макрофагами линии 13. На Т-клетки, специфичные к другому антигену (PPD) в ассоциации с макрофагами обеих родительских линий, отрицательная селекция не влияла. В обратной постановке опыта с использованием нагруженных ОА макрофагов линии 13 в первичной культуре удалялись Т-клетки, специфичные к ОА + макрофаги линии 13, но сохранялись Т-лимфоциты, специфичные к ОА + макрофаги линии 2 (табл. 15.10). Такой отрицательной селекции препятствовали антитела, направленные против Ia-молекул морских свинок, что свидетельствует о необходимости распознавания Т-лимфоцитами антигена в сочетании с молекулами гистосовместимости класса II.

15.2.5.2. Хелперные Т-лимфоциты

Две субпопуляции хелперных Т-лимфоцитов гибридов F_1 , специфичные к одному антигену, были выявлены Спрентом [17] с использованием положительной и отрицательной селекции клеток методом фильтрации *in vivo*. При этом Т-лимфоциты лимфоузлов мышей-доноров вводили вместе с антигеном

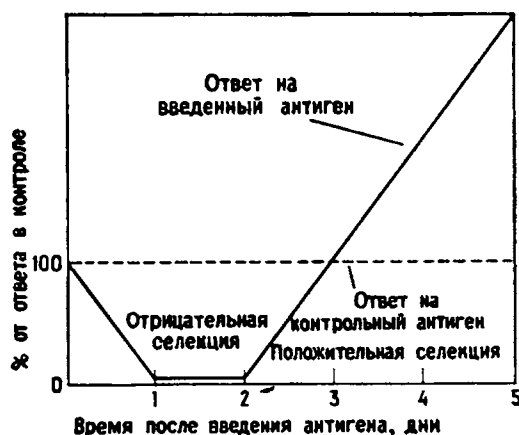


Рис. 15.3. Положительная и отрицательная селекция антиген-специфических Т-клеток при избирательном дренировании лимфоцитов грудного лимфатического протока. В течение первых суток после введения антигена специфические Т-клетки исчезают из центральной лимфы и задерживаются в лимфоидной ткани. После интенсивной пролиферации в лимфоидных органах активированное потомство этих клеток в большом количестве выходит в кровоток. (По [17]; печатается с разрешения.)

в облученных мышей родительских линий или гибридов F_1 . На различные сроки после введения донорские клетки собирали с помощью дренирования грудного лимфатического протока. В нескольких лабораториях было установлено, что в течение первых двух дней после переноса антиген-специфические отвечающие Т-лимфоциты задерживаются в лимфоидных органах (например, селезенке) облученного реципиента и не входят в состав популяции рециркулирующих лимфоцитов (рис. 15.3). Если на этом этапе собирать клетки лимфы грудного протока, то в такой популяции не будет антиген-реактивных клеток (отрицательная селекция). В отличие от этого на 3—5-й день после переноса антиген-реактивные клетки активно пролиферируют в лимфоидных органах и появляются среди рециркулирующих лимфоцитов. Если в это время собирать клетки из

грудного лимфатического протока, то полученная популяция окажется высокообогащенной антиген-реактивными клетками (положительная селекция). Таким образом, одна и та же экспериментальная процедура может быть использована для положительной и отрицательной селекции в зависимости от срока взятия лимфы из грудного протока.

С помощью такой процедуры Спрент [17] исследовал хелперную активность Т-лимфоцитов гибридов F_1 , положительно и отрицательно селектированных в реципиентах родительских линий. Эти Т-лимфоциты вводили облученным F_1 мышам вместе с антигеном (бараньи эритроциты — БЭ), а также В-лимфоцитами и макрофагами (обработанные антителами к Thy-1 и комплементом клетки селезенки) доноров, иммунных к этому антигену. Спустя неделю определяли количество бляшкообразующих клеток, специфичных к БЭ. Если Т-лимфоциты гибридов F_1 ($A \times Q$) подвергали отрицательной селекции с антигеном в облученном реципиенте линии А, то хелперные Т-клетки, взаимодействующие с макрофагами и В-лимфоцитами линии А, специфически выводились из популяции клеток грудного протока (табл. 15.11). Эта популяция кооперирует с макрофагами и В-лимфоцитами мышей линии Q и F_1 ($A \times Q$) при ответе на БЭ. Кроме того, эта популяция кооперирует с макрофагами и В-лимфоцитами линии А при ответе на другой антиген (эритроциты лошади). При исследовании Т-лимфоцитов, положительно селектированных на 5-й день, обнаружена высокая степень обогащения хелперной активности по отношению к В-лимфоцитам и макрофагам линии А (табл. 15.11). Было обнаружено также обогащение хелперной активности этой популяции клеток по отношению к В-лимфоцитам и макрофагам гибридов F_1 , но не к клеткам мышей линии Q.

Таблица 15.11. Положительная и отрицательная селекции хелперных лимфоцитов гибридов F_1 в реципиенте одной из родительских линий ¹⁾ (по [91, 92])

Селекция в реципиенте линии А	В-лимфоциты и МФ	Количество IgG — БОК на селезенку
Отрицательная	А	0
	Q	10 500
	($A \times Q$)	18 100
Положительная	А	275 400
	Q	9 400
	($A \times Q$)	74 500

¹⁾ Т-лимфоциты мышей F_1 вводили облученным реципиентам линии А и иммунизировали БЭ. Клетки грудного лимфатического протока выделяли на 1—2-й день (отрицательная селекция) или на 4—5-й день (положительная селекция) после введения и затем переносили облученным F_1 -реципиентам вместе с антигеном и обработанными антителами к Thy-1 и комплементом клетками селезенки (в качестве источника В-лимфоцитов и макрофагов МФ) иммунных мышей линий А, Q и F_1 ($A \times Q$). Через 7 дней определяли количество бляшкообразующих клеток (БОК), специфичных к БЭ.

Таким образом, при анализе *in vivo* получены те же результаты, что и в исследованиях *in vitro*, а именно: Т-лимфоциты гибридов F_1 состоят из двух субпопуляций, на которые можно избирательно воздействовать. Каждая из этих субпопуляций специфична к одному и тому же антигену в сочетании с продуктами генов МНС одного из родителей.

15.2.6. Клонирование независимых популяций Т-лимфоцитов гибридов F_1

В отличие от исходного определения МНС-рестрикции, т. е. отсутствия взаимодействия различных по антигенам гистосовместимости макрофагов и Т-лимфоцитов, данные по F_1 -субпопуляциям нельзя объяснить аллогенными эффектами. Т-лимфоциты гибридов F_1 толерантны к антигенам гистосовместимости родительских линий. Кроме того, популяция клеток-стимуляторов обязательно инактивируется облучением или митомицином С, а в некоторых случаях обрабатывается антителами к Thy-1 и комплементом, что приводит к полному удалению потенциально аллореактивных Т-лимфоцитов родительских линий. Таким образом, эксперименты с гибридами F_1 убедили большинство клеточных иммунологов в реальности феномена МНС-рестрикции Т-клеточного распознавания. Тем не менее небольшое число исследователей задумывалось над возможностью объяснить эти наблюдения по-иному. В частности, исследователи, изучавшие сложные взаимодействия клеток при индукции супрессорных Т-лимфоцитов (гл. 18), задавались вопросом, нельзя ли объяснить подобные результаты супрессорным механизмом.

Только в самое последнее время были получены данные, однозначно исключающие супрессорный механизм. Такие результаты были получены при изучении клонов Т-лимфоцитов (гл. 30): В этих экспериментах гомогенные популяции Т-лимфоцитов, полученные от одной клетки, характеризовались МНС-рестриктированным распознаванием антигена, т. е. кроме антигена их необходимо было стимулировать макрофагами, несущими определенную молекулу МНС. Результаты экспериментов Средни и Шварца [18] с набором клонов пролиферирующих Т-лимфоцитов мышей F_1 ($B10.A \times B10$), иммунизированных

Таблица 15.12. Специфичность МНС рестрикции Т-клеточных клонов мышей F_1 ($B10.A \times B10$)¹⁾ (по [18])

Т-клеточный пролиферативный ответ (имп./мин) на ГАТ в присутствии АПК мышей					Специфичность	Число колоний
без АПК	B10.A	B10	$F_1(B10.A \times B10)$	B10.A+B10		
170	180	41 300	40 000	36 500	B10	6
120	36 500	80	37 400	34 500	B10.A	4
170	180	130	41 800	180	$F_1(B10.A \times B10)$	3

¹⁾ Тринадцать колоний после клонирования в мягком агаре клеток мышей гибридов F_1 ($B10.A \times B10$), иммунизированных полипептидом поли-(глутаминовая кислота⁶⁰-аланин³⁰-тирозин¹⁰) (ГАТ), наращивали в жидкой культуре и определяли их специфичность, культивируя по 2×10^4 Т-клеток каждой колонии в присутствии ГАТ (100 мкг/мл) и 10^5 облученных клеток линий B10.A, B10, F_1 ($B10.A \times B10$) и смеси по 10^5 клеток селезенки (АПК) B10 и 10^5 B10.A. Пролиферацию определяли спустя 6 дней по включению ³H-тимидина.

синтетическим полипептидом поли-(глутамат⁶⁰-аланин³⁰-тирозин¹⁰) (ГАТ), приведены в табл. 15.12. В соответствии с данными исследований суммарных популяций Т-лимфоцитов было выявлено несколько субпопуляций клонов, специфичных к одному и тому же антигену. Один вид клонов распознавал ГАТ в ассоциации с молекулами МНС линии B10.A. Их пролиферацию стимулировали АПК от линии B10.A или от гибридов F_1 ($B10.A \times B10$) мышей, экспрессирующих молекулы H-2^a, но не АПК мышей линии B10. Другой вид клонов

распознавал ГАТ в ассоциации с молекулами МНС мышей линии В10. Эти клоны стимулировали АПК линии В10 и F_1 ($B10.A \times B10$), но не В10.А. Два вида клонов представляют две предсказанные популяции Т-лимфоцитов гибридов F_1 , которые распознают один и тот же антиген в ассоциации с разными молекулами МНС. Поскольку в этих клонах нет примеси других Т-лимфоцитов, в частности Т-клеток супрессорного ряда, ни один тип супрессорных взаимодействий не может более объяснить феномен МНС-рестрикции. Более вероятно, рестрикция представляет, как и было предположено ранее, свойство распознающих структур отвечающих Т-лимфоцитов.

15.2.7. F_1 -специфические клоны Т-лимфоцитов

Интересно, что при клонировании была выявлена третья субпопуляция антиген-специфических Т-клеток гибридов F_1 . Эта популяция оказалась специфичной к антигену в ассоциации с уникальными молекулами гистосовместимости гибридов F_1 . Как следует из табл. 15.12, Т-клоны этого вида можно было стимулировать ГАТ только в ассоциации с АПК мышей F_1 . АПК ни одной из родительских линий, даже будучи смешанными, не были способны индуцировать ответ. Чтобы объяснить такую F_1 -специфическую рестрикцию, необходимо знать структуру молекул гистосовместимости, распознаваемых Т-клеточными клонами. Как было сказано в гл. 14, молекулы а-антигенов состоят из двух белковых субъединиц, α - и β -цепей, кодируемых разными генами. Существование уникальных антигенов гистосовместимости гибридов F_1 можно объяснить тем, что α - и β -цепи молекулы данного Ia-белка случайно ассоциируются в цитоплазме, т. е. α -цепь, кодируемая аллельным вариантом одного родительского гаплотипа, может соединяться с β -цепью, кодируемой аллельным вариантом другого родительского гаплотипа МНС. Таким образом, возможны четыре комбинации: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_2\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$; $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$ представляют формы, выявляемые в двух родительских линиях, а молекулы $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$ встречаются только у гибридов F_1 . Следовательно, клоны Т-клеток, распознающие антиген в ассоциации с молекулами $\alpha_1\beta_2$ или $\alpha_2\beta_1$, характеризуются F_1 -специфическим фенотипом. Существование таких клонов служит еще одним доводом в пользу предположения о том, что МНС-рестрикция представляет собой характерную особенность распознавания молекул МНС Т-клетками.

15.2.8. Рестриктирующими элементами распознавания пролиферирующих Т-лимфоцитов являются МНС-молекулы класса II

Существование трех разных субпопуляций Т-лимфоцитов гибридов F_1 , рестриктированных по области I и специфичных к одному антигену, свидетельствует в пользу модели Т-клеточного рецептора, распознающего «свое». Однако предположение о существовании аллельного исключения СИ-молекул хелперных клеток делает вероятной модель взаимодействия подобных структур, что оказалось столь же трудно опровергнуть, как и в случае цитотоксических Т-лимфоцитов. Первые доказательства заключались в том, что антисыворотки и моноклональные антитела, направленные против молекул класса II (антитела к Ia-белкам), ингибируют пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на антиген. Как отмечалось выше, возражения против этих доказательств основываются на факте существования близко сцепленных генов, кодирующих структуры клеточных взаимодействий. Такая возможность согласуется с тем, что у некоторых видов, в частности у мышей, молекулы Ia не выявляются на отвечающих Т-клетках.

Сравнительно недавно Мэлволд и Кон (Melvold, Kohn) получили мутантную линию мышей, названную B6.C-H-2^{bm12}. Эта линия, по данным Мак-Кина (McKean), несет мутацию гена, кодирующего A_β-полипептидную цепь молекулы I-A. Кроме того, как показали Кимото и др. [19], некоторые клоны Т-лимфоцитов, полученные от мышей F₁ (B6 × A), отвечают на антиген в ассоциации с макрофагами F₁ (B6 × A), но не F₁ (bm12 × A). Для активации этих клонов необходима нормальная молекула A_β^b. В противоположной комбинации линий подобные эксперименты пока не проводили, т. е. не были получены клоны Т-клеток F₁ (bm12 × A). Тем не менее из этих экспериментов очевидно, что именно Ia-молекулы, экспрессированные на поверхности макрофага, являются структурами, непосредственно участвующими в МНС-рестриктированных взаимодействиях пролиферирующих Т-лимфоцитов и макрофагов.

Исходя из этого, можно сделать вывод о несостоятельности модели взаимодействия подобных структур, поскольку Ia-молекулы на мышинных Т-клетках не определяются. Т-клетка должна обладать другими молекулами — распознающими структурами, комплементарными Ia-молекулам макрофага.

15.2.9. Повторное обсуждение вопроса о МНС-рестрикции взаимодействий Т- и В-клеток

В этом месте нашего обсуждения следует заново рассмотреть поднятый ранее вопрос: существует ли рестрикция взаимодействия Т- и В-лимфоцитов? Читатель помнит, что бесспорное доказательство генетической рестрикции взаимодействий Т-клеток и макрофагов, одного из самых ранних событий в ходе иммунного ответа, оставляет открытой возможность нерестриктированных взаимодействий на последующих этапах ответа. Все эксперименты, направленные на изучение этого вопроса, построены сходным образом с использованием субпопуляций Т-лимфоцитов одной антигенной специфичности гибрида F₁. В этих опытах Т-лимфоциты F₁ (A × Q) стимулировали антигеном в присутствии макрофагов линии А. Затем определяли, будут ли полученные Т-клетки, которые должны быть специфичны к антигену в сочетании с молекулами МНС линии А, взаимодействовать только с В-лимфоцитами линии А (рестриктированное взаимодействие) или с В-лимфоцитами каждой из родительских линий А и Q (нерестриктированное взаимодействие). Хотя этот эксперимент и несложен, но, к сожалению, однозначного ответа получено не было.

В зависимости от использованной схемы эксперимента исследователи обнаруживали то рестриктированные, то нерестриктированные взаимодействия. Например, Мак-Дугал и Корт [20] иммунизировали *in vitro* Т-лимфоциты F₁ (A × Q) нагруженными антигеном макрофагами и затем использовали эти Т-клетки для кооперации с иммунными к антигену В-лимфоцитами и макрофагами родительских линий (табл. 15.13). Такие Т-клетки взаимодействовали преимущественно с макрофагами родительской линии, использованной для примирования. Однако эта генетическая рестрикция распространялась только на взаимодействия между макрофагами и Т-клетками. Если при определении способности Т-клеток гибридов F₁, примированных к антигену в сочетании с макрофагами линии А, взаимодействовать с В-лимфоцитами линии Q, во вторичную культуру добавляли макрофаги линии А, то наблюдался антительный ответ В-лимфоцитов линии Q (989 БОК с макрофагами А и 349 БОК с макрофагами Q). Следовательно, взаимодействие Т- и В-лимфоцитов является нерестриктированным. Сходные результаты были получены при иммунизации Т-клеток гибридов F₁ макрофагами линии Q (табл. 15.13, вторая строчка).

Таблица 15.13. Отсутствие рестриктированных Т-В-взаимодействий *in vitro*¹⁾ (по 20)

Источник макрофагов в первичной культуре	IgG-ответ БОК во вторичной культуре			
	В-лимфоциты линии А		В-лимфоциты линии Q	
	МФ А	МФ Q	МФ А	МФ Q
Линия А	1 096	1 018	989	349
Линия Q	262	1 438	1 480	1 227

¹⁾ В первичной культуре $F_1(A \times Q)$ Т-клетки иммунизировали *in vitro* макрофагами (МФ) линии А, или Q, нагруженными антигеном (гемоцианином моллюска фисуреллы, KLH). Через 4 дня клетки собирали, макрофаги удаляли на колонках с нейлоновой ватой и оставшиеся Т-лимфоциты использовали в качестве источника хелперных Т-клеток. Эти клетки добавляли во вторичную культуру, содержащую В-лимфоциты и макрофаги (обработанные антителами к Thy-1 и комплементом клетки селезенки) мышей, иммунных к гаптену (ДНФ-фиколл), и культуры стимулировали ДНФ-KLH. Дополнительно добавляли макрофаги той и другой линии, чтобы устранить генетическую рестрикцию. Непрямые (IgG) БОК определяли через 4 дня. Курсивом выделен уровень ответа, значимо превышающий контроль без добавления антигена.

В отличие от этого ответа БОК не наблюдалось, когда Спрент [17] при анализе *in vivo* вместе с В-лимфоцитами мышей линии Q переносил Т-клетки гибридов F_1 , положительно селектированные примированием в реципиентах линии А, облученным мышам F_1 (см. табл. 12.11). Даже если облученным реципиентам вводили клетки костного мозга мышей F_1 для заселения лимфоидных органов избытком макрофагов от гибридов F_1 , кооперативного ответа не наблюдалось. Поэтому Спрент сделал противоположный вывод о том, что взаимодействия Т- и В-лимфоцитов генетически рестриктированы.

Решение этой проблемы предложили Асано и др. [21]. Описанные расхождения в результатах они объяснили тем, что популяция В-лимфоцитов состоит из двух различных субпопуляций, каждая из которых может по-разному активироваться Т-клетками. Для активации одних В-лимфоцитов, несущих поверхностный маркер Lyb5, которых нет у мышей CBA/N, кроме высоких концентраций антигена необходимы только растворимые Т-клеточные факторы (лимфокины, такие, как фактор роста В-лимфоцитов). В этом случае гаптены и детерминанты носителя не обязательно должны быть презентированы на одной и той же молекуле, а образующиеся антитела в основном относятся к IgM-классу. Другой субпопуляции В-лимфоцитов, у которой нет маркера Lyb5, но которая имеется у мышей линии CBA/N, для индукции ответа в основном IgG-класса необходимо рестриктированное кооперативное взаимодействие с Т-клетками в сочетании с низкими концентрациями антигена. Кроме того, гаптен должен быть связан с молекулой носителя. Таким образом, в зависимости от условий индукции Т-хелперов можно выявить как рестриктированные, так и нерестриктированные взаимодействия Т- и В-лимфоцитов.

Наиболее убедительный пример из этих исследований приведен в табл. 15. 14. В данном эксперименте хелперную активность Т-клеточного клона $F_1(A \times Q)$, специфичного к KLH в ассоциации с МНС-А-молекулами класса II, определяли *in vitro* на макрофагах и иммунных к ТНФ В-лимфоцитах линий А и Q. Если использовались низкие дозы антигена (ТНФ-KLH; 1 нг/мл), то активировались только В-лимфоциты линии А — даже в тех случаях, когда добавляли макрофаги F_1 , чтобы избежать рестрикции при взаимодействии макрофаг — Т-клетка. В отличие от этого при высоких концентрациях антигена (20 мкг/мл) отсутствие активации клетками клона В-лимфоцитов линии Q компенсировалось

добавлением макрофагов F_1 . Иными словами, рестрикция при такой дозе антигена распространялась только на взаимодействия между макрофагом и Т-клетками. Способность одного и того же клона Т-клеток участвовать в рестриктированной и нерестриктированной кооперации в зависимости от активируемой

Таблица 15.14. МНС-рестрикция взаимодействий Т- и В-лимфоцитов зависит от условий определения ¹⁾ (по [21])

Доза ТНФ-КЛН, мкг/мл	Добавление макрофагов F_1 (A×Q)	Анти-ТНФ БОК/культура В-лимфоцитов и макрофагов	
		Линия А	Линия Q
0,001	—	2 832±398	19±19
20	+	2 438±166	38±25
	—	595±69	0
	+	451±62	365±47
	+		

¹⁾ Т-клеточный клон F_1 (A×Q), специфичный к антигену (КЛН) только в сочетании с молекулами МНС класса II линии А, стимулировали низкими (0,001 мкг/мл) или высокими (20 мкг/мл) концентрациями ТНФ-КЛН в присутствии В-лимфоцитов и макрофагов (клеток селезенки, обработанных антителами к Т-клеткам и компонентом) линии А или Q. Через 5 дней определяли количество БОК: IgG при ответе на низкие дозы и IgM при ответе на высокие дозы антигена. Достоверные значения хелперной активности выделены курсивом.

субпопуляции В-лимфоцитов иллюстрирует как будто тривиальное, но полностью справедливое утверждение о том, что в клеточных взаимодействиях участвуют два типа клеток. Для понимания этих взаимодействий необходимо полностью учитывать природу и функцию каждой из взаимодействующих популяций.

15.2.10. Модель МНС-рестриктированного Т-клеточного распознавания

Из описанных выше экспериментов ясно, что большинство Т-лимфоцитов распознает антигены только в ассоциации с продуктами генов МНС. Поэтому, как показано на рис. 15.4, в основе общей схемы МНС-рестриктированных клеточных взаимодействий в ходе иммунного ответа лежит представление о том, что Т-лимфоцит обладает рецепторной структурой с двойной специфичностью: один компонент специфичен к молекуле МНС, а другой — к антигену. Для активации индукторных Т-лимфоцитов макрофаг должен презентировать и антиген, и молекулы класса II. После активации такая клетка может принимать участие в МНС-рестриктированных взаимодействиях с В-лимфоцитами благодаря распознаванию молекул класса II на поверхности В-лимфоцита в сочетании с антигеном, который, по-видимому, связывается иммуноглобулиновыми рецепторами В-клетки. Как отмечалось ранее, некоторым субпопуляциям В-лимфоцитов не нужен непосредственный контакт с Т-клетками и их нерестриктированная активация происходит в присутствии антигена и растворимых Т-клеточных факторов (лимфокинов). Наконец, цитотоксические Т-лимфоциты специфичны к антигену и молекулам МНС класса I; они активируются при взаимодействии с этими молекулами в присутствии лимфокинов, продуцируемых индукторными Т-клетками. Природа АПК (эквивалентных макрофагам), участвующих в активации цитотоксических Т-лимфоцитов, не ясна, но, вероятно, ими может быть любая

клетка организма, поскольку все клетки несут молекулы МНС класса I и могут служить клетками-мишенями в цитотоксической реакции. Такое представление

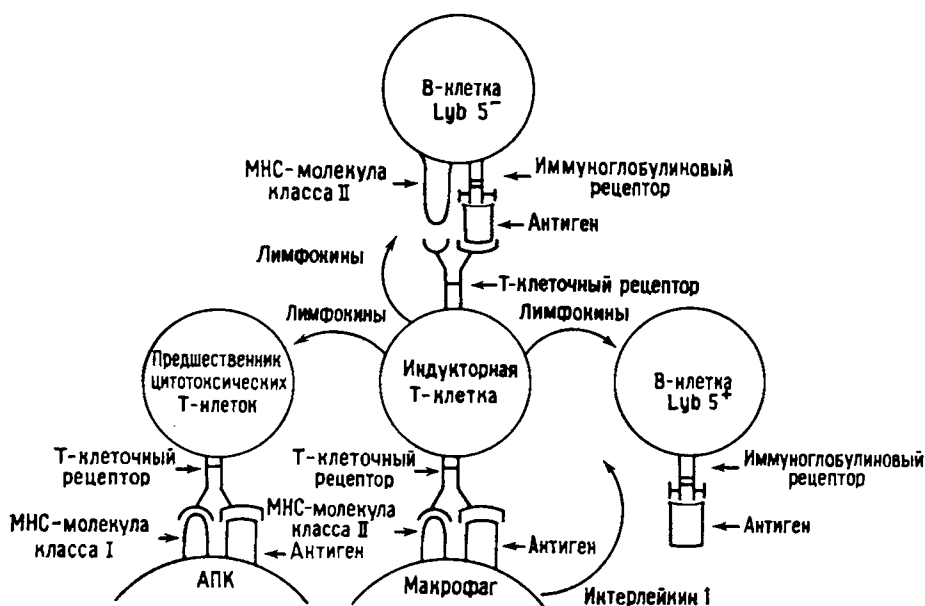


Рис. 15.4. Модель МНС-рестриктированных взаимодействий в ходе развития иммунного ответа.

о двойной специфичности согласуется с рядом различных физических моделей Т-клеточного рецептора. С этим вопросом читатель может детальнее ознакомиться в гл. 11.

15.3. Природа МНС рестрикции: примиривание или онтогенез?

В начале 70-х гг., когда впервые была обнаружена МНС-рестрикция при смешивании клеток двух линий мышей или морских свинок, различающихся по антигенам гистосовместимости, было много скептиков, утверждавших, что смешивание аллогенных клеток дает лишь ложно-отрицательные результаты и отнюдь не свидетельствует о феномене МНС-рестрикции. С целью опровержения формирующихся представлений эти исследователи разработали новый экспериментальный подход: прежде чем исследовать способность аллогенных клеток к кооперативным взаимодействиям, у них индуцировали полную взаимную толерантность. При этих условиях удалось убедительно показать взаимодействие аллогенных Т- и В-лимфоцитов (плюс макрофаги). Сначала на основании этих данных иммунологи сделали вывод, что МНС-рестрикция является артефактом. Однако когда в опытах с цитотоксической системой были получены доводы в пользу рестрикции и в особенности после того, как были проведены эксперименты с клетками гибридов F_1 , стало очевидным, что МНС-рестрикция не может быть связана с аллогенными эффектами. Именно в этот момент исследователи, работавшие в этой области, поняли, что перед ними ряд противоречивых данных, нуждающихся в новой интерпретации. Поскольку эти эксперименты послу-

жили исходным стимулом к развитию данной области, а следовательно, и к изучению природы МНС-рестрикции, мы рассмотрим их здесь детально, а затем обсудим теоретическое значение и дальнейшие экспериментальные исследования природы МНС-рестрикции. Этот круг проблем является на сегодняшний день одной из основной тем дебатов в клеточной иммунологии, и поэтому много места будет уделено детальному описанию данных, поддерживающих две основные альтернативные точки зрения.

15.3.1. Аллогенные Т-лимфоциты и В-лимфоциты способны к эффективному взаимодействию

Наиболее успешный подход к выявлению возможных взаимодействий аллогенных Т- и В-лимфоцитов заключался в использовании костномозговых химер. Эту модель *in vivo* разработали фон Бёмер и др. [22], исходя из ранних исследований по трансплантации костного мозга. Основное новшество, которое они ввели, сводилось к предварительному удалению с помощью обработки антителами против *Thy-1* и комплементом зрелых Т-лимфоцитов периферической крови, которые, как правило, загрязняют препараты костного мозга. Такая обработка предотвращала реакцию трансплантат против хозяина и позволяла стволовым клеткам костного мозга нормально развиваться в микроокружении облученного реципиента. Реципиента детально облучали в дозах 850—950 рад для подавления гемопоэза и функциональной активности зрелых лимфоидных клеток, после чего вводили костномозговые клетки донора. Такое животное называется химерой, так как генотип кроветворных клеток донора в большинстве экспериментов отличается от генотипа других тканей реципиента, устойчивых к облучению.

Схема эксперимента заключалась в следующем: у мышей двух различных линий А и Q извлекали костный мозг без примеси Т-клеток. Затем смесь этих клеток вводили облученным реципиентам $F_1(A \times Q)$. Такие химеры обозначаются $P_1(\text{к.м.}) + P_2(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{обл.})$ ¹⁾. Спустя три месяца эти животные становились иммунокомпетентными, причем их иммунная система была представлена приблизительно равным количеством донорских клеток двух типов. Т-клетки с генотипом одного из двух родителей выделяли из иммунных химерных мышей следующим путем. Вначале удаляли В-лимфоциты и макрофаги на колонках с нейлоновой ватой, а затем — Т-клетки с генотипом другого родителя, обрабатывая клетки антителами против МНС и комплементом. Хелперную активность популяции Т-лимфоцитов линии Q, полученной от химерных животных, определяли по числу бляшкообразующих клеток (БОК), лизирующих бараньи эритроциты (БЭ, SBRC) с использованием иммунных В-лимфоцитов и макрофагов (обработанных антителами против *Thy-1* и комплементом клеток селезенки) линии А или Q.

¹⁾ В этой главе описываются различные химеры, сконструированные с использованием разных реципиентов и тканей. Для обозначения всех химер используется следующая номенклатура: А (ткань) → В (реципиент). «А» обозначает символ или наименование донорской линии, затем в скобках указывается трансплантируемая ткань, например к. м. (костный мозг) или тим (тимус). Если используется более одного источника клеток или тканей, то они указываются отдельно и разделяются знаком «плюс», например, А (к. м.) + Q (тим.). «В» обозначает символ или наименование линии реципиента. Затем в скобках указываются любые воздействия или особые характеристики, способствующие приживлению трансплантата, например, обл. = летальное облучение, пу — бестимусная (nude) мышь, АТХ — тимэктомизированные во взрослом состоянии и летально облученные. Стрелка обозначает направление пересадки: донор — справа, реципиент — слева.

Как видно из табл. 15.15, химерные Т-лимфоциты линии Q взаимодействовали с аллогенными В-лимфоцитами и макрофагами линии А почти столь же эффективно, как и с сингенными В-лимфоцитами и макрофагами линии Q. Из этого авторы заключили, что аллогенные Т-лимфоциты и В-лимфоциты (или макрофаги), несмотря на различия по МНС, могут кооперировать, если они представляют взаимно толерантные популяции (т.е. если они не содержат алло-реактивных клеток).

Таблица 15.15. Т-клетки химер могут взаимодействовать с аллогенными В-лимфоцитами (по [22])

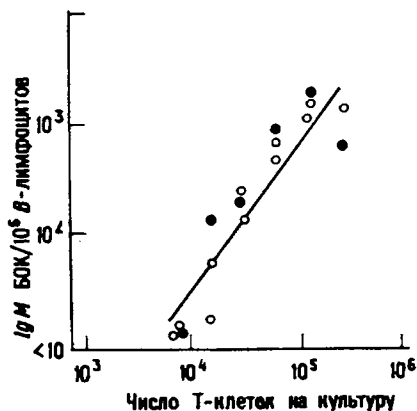
Происхождение Т-клеток 1)	Источник В-лимфоцитов 2)	Количество IgG-БОК
Химерные, линия Q	Нет	969
Нет	Линия Q	2700
Нет	Линия А	907
Химерные, линия Q	Линия Q	35 100
Химерные, линия Q	Линия А	17 763

1) Q (к. м.) + А (к. м.) $\rightarrow$ F₁ (Q $\times$ А) (обл.) химер первично иммунизировали бараными эритроцитами (БЭ), и химерные Т-клетки линии Q выделяли на колонках с нейлоновой ватой с последующей обработкой антисывороткой против МНС-А и комплементом.

2) Клетки селезенки мышей, иммунных к бараньим эритроцитам, обработанные антителами против Thy-1 и комплементом.

Вначале эти данные вызвали сомнение в правомерности самой концепции МНС-рестрикции, которая рассматривалась как артефакт, связанный с алло-реактивностью. В пользу такого вывода свидетельствовала ранняя работа Хебер-Кац и Вильсона [23] по интенсивному истощению аллореактивных клеток

Рис. 15.5. Толерантные аллогенные Т-клетки обладают хелперной функциональной активностью. Первичный антителный ответ В-лимфоцитов крыс линии Q на бараньи эритроциты в присутствии различного числа Т-клеток сингенных крыс (прямая линия) представляет средние значения из 8 экспериментов), семиаллогенных крыс F₁ (А $\times$ Q) (темные кружки) и аллогенных крыс А (светлые кружки). В последнем случае аллореактивные клетки линии А удаляли с помощью отрицательной селекции в облученном реципиенте F₁. (По [23]; печатается с разрешения.)



крыс. При такой постановке эксперимента аллореактивные клетки линии А, направленные против антигенов гистосовместимости другой линии Q, удаляли фильтрацией *in vivo* в реципиенте F₁(А $\times$ Q) с использованием двухдневной отрицательной селекции (рис. 15.3) для фракционирования антиген-специфических субпопуляций Т-клеток от гибридов F₁. Полученные в результате отрицательной селекции клетки грудного лимфатического протока обрабатывали

антисывороткой против В-лимфоцитов крыс и комплементом. Оставшиеся Т-клетки оказались ареактивными по отношению к антигенам гистосовместимости линии Q в реакции смешанной культуры лимфоцитов или трансплантат против хозяина, которая измеряется по увеличению размера подкожных лимфоузлов крыс F₁. Если такие Т-клетки линии A смешивать с популяцией В-лимфоцитов линии Q, то аллогенные клетки будут взаимодействовать при ответе прямых БОК на БЭ. Как показано на рис. 15.5, в пересчете на количество Т-клеток аллогенные Т-лимфоциты оказывали столь же выраженный хелперный эффект, как и сингенные F₁-клетки. Эти результаты интерпретировались как отсутствие барьера гистосовместимости для взаимодействия Т-и В-лимфоцитов при удалении аллореактивных Т-клеток (острое истощение). Таким образом, опыты по острому истощению и с химерами, по-видимому, не противоречат друг другу и указывают на то, что феномен МНС-рестрикции является артефактом аллогенных эффектов.

15.3.2. Две разные МНС-рестриктированные субпопуляции Т-лимфоцитов в химерах P₁ (к. м.) → F₁ (обл.)

Когда исследователи, работавшие с цитотоксическими Т-лимфоцитами, приступили к изучению радиационных костномозговых химер, они получили данные, которые помогли увязать большинство имеющихся данных с концепцией МНС-рестрикции. В первых экспериментах Пфиценмайер и др. [24] вводили летально облученным реципиентам F₁ (A × Q) клетки костного мозга одной родительской линии A, не содержащие Т-лимфоцитов. Такие химеры P₁(к.м.) → F₁ (обл.) иммунизировали вирусом ЛХМ и затем определяли цитотоксическую активность клеток селезенки на инфицированных вирусом макрофагах каждой из родительских линий (A или Q) или третьей линии (Z). Как видно из табл. 15.16, эти цитотоксические Т-клетки с фенотипом линии A лизировали

Таблица 15.16. Цитотоксические Т-клетки химер способны лизировать аллогенные мишени, к которым они толерантны¹⁾ (по [24])

Отношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням	Процент специфического лизиса инфицированных вирусом мишеней		
	Макрофаги линии A	Макрофаги линии Q	Макрофаги линии Z
50 : 1	63	27	0
5 : 1	30	9	1

¹⁾ Химеры A (к. м.) – F₁ (A × Q) (обл.) инфицировали вирусом ЛХМ через 8 мес после введения костного мозга и спустя 7 дней определяли цитотоксическую активность Т-клеток селезенки против инфицированных вирусом макрофагов. Специфический лизис не обнаружен на неинфицированных клетках-мишенях.

инфицированные вирусом макрофаги родительской линии Q, хотя и не так эффективно, как инфицированные вирусом макрофаги линии A. Инфицированные вирусом макрофаги третьей линии Z не лизировались такими клетками. Таким образом, подобно результатам исследований хелперных Т-клеток, эти эксперименты показали, что цитотоксические клетки способны распознавать

аллогенные мишени, инфицированные вирусом, если животное толерантно к этим аллоантигенам.

Новые интересные результаты были получены также при исследовании способности таких химер $P_1(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{обл.})$ отвечать на ТНФ-модифицированные клетки селезенки. Если неиммунные Т-лимфоциты химерных мышей культивировались с аллогенными ТНФ-модифицированными клетками селезенки линии Q, то генерировались цитотоксические Т-клетки, специфически лизировавшие ТНФ-модифицированные клетки линии Q, но не сингенной линии A (табл. 15.17). Подобным образом если ТНФ-модифицированные клетки линии A

Таблица 15.17. Две субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов химер $P_1(\text{к. м.}) \rightarrow F_1(\text{обл.})$, специфичные к одному антигену¹⁾ (по [24])

ТНФ-модифицированные стимуляторы	Процент специфического лизиса мишеней			
	A	ТНФ-A		ТНФ-Q
Линия A	0	48	—	4
Линия Q	—1	1	0	22

¹⁾ Клетки селезенки химерных мышей $A(\text{к. м.}) \rightarrow F_1(A \times Q)(\text{обл.})$ стимулировали *in vitro* ТНФ-модифицированными клетками селезенки линии A или Q. Через 5 дней определяли цитотоксическую активность против различных мишеней (лимфобластов, индуцированных ЛПС). Отношение эффекторов к мишеням составляло 40 : 1.

использовались в качестве стимуляторов, то индуцированные цитотоксические Т-клетки были специфичны к ТНФ-модифицированным мишеням линии A, но не линии Q. Эти результаты подобны данным, полученным ранее для нормальных отвечающих популяций Т-лимфоцитов гибридов F_1 (табл. 15.6 и 15.9—15.11). Они указывают на существование в химерах двух независимых субпопуляций цитотоксических Т-клеток, одна из которых специфична к антигену в ассоциации с сингенными молекулами МНС, а другая специфична к антигену в ассоциации с аллогенными молекулами МНС (второго родителя).

Этот вывод нашел убедительное подтверждение в работах Цинкернагеля [25], использовавшего положительную селекцию и холодное торможение ответа цитотоксических Т-клеток. Пример последних приведен в табл. 15.18. Химерам $P_1(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{обл.})$ вводили вирус ЛХМ через 4—10 дней после пересадки костного мозга и спустя 7 дней определяли цитотоксическую активность клеток селезенки против инфицированных вирусом мишеней родительских линий A или Q. Клетки селезенки оказались способны лизировать оба вида мишеней, хотя отвечающая популяция характеризовалась фенотипом линии A, т.е. цитотоксическая активность этой популяции подавлялась при обработке антителами против Н-2^a и комплементом, но не антителами против Н-2^q и комплементом (табл. 15.18). Однако активность субпопуляции цитотоксических Т-клеток, лизировавших инфицированные вирусом клетки-мишени линии A, подавлялась шестикратным избытком немеченых (холодных) инфицированных мишеней только линии A, но не линии Q. Вместе с тем активность субпопуляции, лизировавшей инфицированные вирусом мишени линии Q, угнеталась шестикратным избытком немеченых инфицированных мишеней линии Q, но не A. Таким образом, популяция Т-клеток химер состоит из двух субпопуляций антиген-специфических клеток, функциональная активность которых рестриктирована молекулами МНС одного из двух родителей. Спустя три года те же выводы

Таблица 15.18. При исследовании холодного торможения выявляются две субпопуляции цитотоксических Т-клеток в химерах P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)¹⁾ (по [25])

Обработка антителами против Н-2	Холодные мишени	% выхода ^{51}Cr из инфицированных вирусом мишеней	
		Линии А	Линии Q
Нет	Нет	58	57
Анти-А	Нет	35	19
Анти-Q	Нет	56	54
Нет	Линия А	38	55
Нет	Линия Q	54	20

1) Химер A (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) иммунизировали вирусом ЛХМ и определяли цитотоксическую активность клеток их селезенки против инфицированных вирусом мишеней линии А или Q. Было установлено донорское происхождение всех цитотоксических клеток (линии А), так как только антисыворотка против Н-2^а подавляла цитотоксическое действие. Специфичность цитотоксических клеток определяли, подавляя лизис шестикратным избытком немеченых (холодных) инфицированных вирусом мишеней. Курсивом выделен значимый уровень подавления.

сделали Спрент и фон Бёмер [26] при использовании метода положительной и отрицательной селекции.

После опубликования исследований цитотоксических Т-лимфоцитов химер P_1 (к.м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) стало невозможно рассматривать феномен МНС-рестрикции как артефакт аллогенных эффектов. Т-клетки таких химер полностью толерантны к антигенам гистосовместимости обоих родителей, и тем не менее они состоят из двух субпопуляций антиген-специфических Т-клеток, каждая из которых распознает только один вид молекул МНС. Этот результат в сочетании с данными, полученными с использованием гибридов F_1 , четко доказывал феномен МНС-рестрикции.

15.3.3. Гипотеза первичной иммунизации (примирования)

Теперь проблема состояла в том, чтобы выяснить причину расхождений результатов ранних экспериментов по МНС-рестрикции и поздних экспериментов с химерами и острым истощением (табл. 15.15) (рис. 15.5). Выдвинутая в 1977 г. основная гипотеза, объясняющая это противоречие, указывала на критическую роль микроокружения, в котором индуцируется первичный ответ Т-клеток. В ранних экспериментах Т-клетки линии А первично иммунизировали в микроокружении линии А. Тогда независимо от потенциального репертуара распознавания Т-лимфоцитов линии А активируются и размножаются только Т-клетки, распознающие антиген в окружении молекул МНС линии А. Другими словами, подобно положительной селекции в экспериментах с гибридами F_1 (табл. 15.6, 15.9 и 15.11), Т-клетки, способные распознавать антиген в окружении молекул гистосовместимости линии Q, не будут выявлены, так как они не размножаются. В отличие от этого в радиационных костномозговых химерах типа P_1 (к.м.) + P_2 (к.м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) представлены при иммунизации клетки линии А и Q. Таким образом Т-клетки линии А сталкиваются с антигеном в ассоциации с макрофагами и линии А, и линии Q. Если Т-клетки линии А способны распознавать антиген в окружении молекул МНС линии Q наряду с распознаванием антигена в сочетании с молекулами МНС линии А, то будут активированы две субпопуляции Т-клеток, как и у животных F_1 . В опытах

по острому истощению исследовали первичный иммунный ответ. В этом случае Т-клетки линии А первый раз контактировали с В-лимфоцитами и макрофагами линии Q *in vitro*. При этом ответ на клетки линий А и Q был сравнимым.

Все эти результаты согласуются с гипотезой о том, что животные родительских линий, подобно F_1 , обладают двумя субпопуляциями Т-лимфоцитов, каждая из которых распознает антиген в ассоциации с молекулами МНС одной из двух линий. Поскольку можно выбрать любую другую линию в качестве партнера для F_1 -гибридизации, то эта модель в обобщенной форме предсказывает, что популяция Т-лимфоцитов каждой линии способна распознавать антиген в ассоциации с молекулами МНС всех остальных линий. В таком случае МНС-рестрикция оказывается лишь следствием первичной иммунизации, что связано с двойной специфичностью Т-клеточного рецептора к антигену и молекуле МНС. Рестрикция взаимодействий пролиферирующих и хелперных Т-лимфоцитов определяется тем, что первично активированные Т-клетки при вторичном ответе должны повторно встретиться с теми же молекулами МНС класса II В-лимфоцитов и макрофагов, что и при первичном ответе. При ответе цитотоксических Т-лимфоцитов клетки-мишени должны экспрессировать те же поверхностные молекулы МНС класса I, что и клетка (чья природа точно неизвестна), вызвавшая первичную активацию и дифференцировку клеток-предшественников в эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты.

15.3.4. Нормальные хелперные Т-лимфоциты линии А не распознают антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС

В 1975 г. Киндред [27] провела эксперименты на бестимусных мышах (nude), результаты которых ретроспективно не согласовывались с гипотезой первичной иммунизации. Новорожденным мышам линии А вводили клетки селезенки

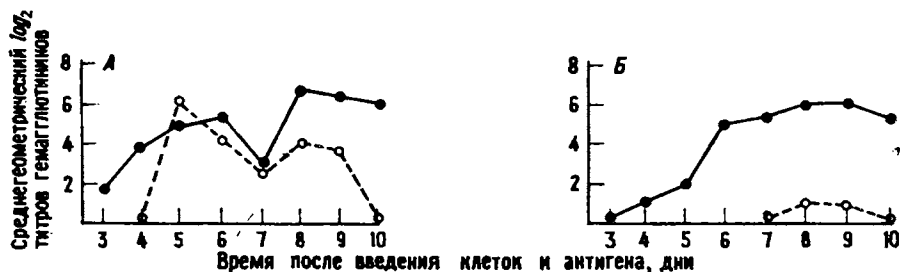


Рис. 15.6. Неонатально толерантные аллогенные клетки селезенки не восстанавливают иммунореактивность бестимусных мышей.

Бестимусным мышам линии Q вводили сингенойные клетки селезенки линии Q (темные кружки) или аллогенные клетки селезенки линии А от доноров с неонатально индуцированной толерантностью к антигенам гисто-

совместимости линии Q (светлые кружки). Реципиентов иммунизировали (0-й день) и повторно стимулировали (7-й день) бараньими эритроцитами. Титр геммагглютинирующих антител определяли от 3-го до 10-го дня. А. Суммарный антительный ответ (IgM + IgG). Б. Антительный ответ, устойчивый к действию 2-меркаптоэтанола (только IgG). (По [27]; печатается с разрешения.)

$F_1(A \times Q)$, чтобы индуцировать толерантность к антигенам гистосовместимости линии Q (классический эксперимент Брента и Медавара, см. гл. 20). Тимоциты и клетки селезенки таких мышей линии А, толерантных к антигенам гистосовместимости линии Q, не поддерживали антительного ответа бестимусных мышей линии Q на БЭ (рис. 15.6). Слабый ответ иногда наблюдался на 4—10-й

день, но почти полностью был представлен IgM-антителами. В отличие от этого сингенные клетки селезенки поддерживали нормальный ответ, который продолжал нарастать при вторичной иммунизации и был представлен IgG-антителами. Таким образом, удаление аллореактивных клеток не приводит к выявлению полностью аллогенных взаимодействий Т- и В-лимфоцитов (плюс макрофаги), при которых наблюдается выраженное образование IgG-антител.

Согласно гипотезе первичной иммунизации, тимоциты и клетки селезенки линии А должны содержать Т-клетки, специфичные к антигену в ассоциации с молекулами МНС линии Q. Поскольку эта клеточная популяция не была первично активирована, такие Т-клетки должны встречаться с той же частотой, что и Т-клетки, специфичные к антигену в ассоциации с молекулами МНС линии А, т.е. не должно быть избирательного распознавания. Более того, макрофаги и В-лимфоциты в этом эксперименте получены от бестимусных мышей и характеризуются фенотипом линии Q. Следовательно, первичная иммунизация должна приводить к избирательному размножению Т-клеток, рестриктированных по молекулам МНС линии Q и способных кооперировать с В-лимфоцитами линии Q. Однако наблюдался лишь слабый IgM-ответ.

Эти результаты не противоречат опытам Хебер-Кац и Вильсона [23] (рис. 15.5). И в тех и в других опытах исходный первичный IgM-ответ был сравним при сингенных и аллогенных взаимодействиях клеток. Только на поздних сроках (более 7 дней), и в особенности после вторичной иммунизации, появлялись различия между аллогенной и сингенной комбинацией клеток в опытах Киндред [27]. Хебер-Кац и Вильсон [23] не исследовали ответ на этих сроках. Итак, если рассматривать концепцию МНС-рестрикции как необходимость двойного распознавания антигена и молекул МНС рецептором Т-лимфоцитов, то результаты Киндред указывают на то, что в популяции Т-лимфоцитов линии А нет клеток, специфичных к молекулам МНС линии Q и при этом способных генерироваться после первичной иммунизации.

В дальнейших опытах Спрента [17], поставившего эксперимент по схеме, использованной Хебер-Кац и Вильсоном [23] (рис. 15.3 и 15.5), были получены результаты, сходные с данными Киндред [27]. Спрент исследовал популяцию Т-клеток лимфатических узлов непримированных мышей линии А, из которой в результате отрицательной селекции, осуществленной фильтрацией через мышей $F_1(A \times Q)$, были удалены аллореактивные Т-клетки, специфичные к молекулам МНС линии Q. Однако в отличие от Хебер-Кац и Вильсона Спрент не определял первичный ответ *in vitro*. Вместо этого он переносил отрицательно селектированные Т-клетки облученным реципиентам $F_1(A \times Q)$ и затем иммунизировал их бараньими эритроцитами (БЭ). У реципиентов F_1 представлены были АПК, которые несут молекулы МНС каждого из родителей и которые, следовательно, должны вызывать стимуляцию антиген-специфических Т-клеток, рестриктированных по антигенам гистосовместимости линий А и Q. На 5-й день иммунные Т-лимфоциты собирали через грудной лимфатический проток (стадия положительной селекции) и затем определяли их способность к кооперативному ответу на БЭ с сингенными и аллогенными В-лимфоцитами и макрофагами при переносе третьему облученному реципиенту. Полученные результаты (представленные в табл. 15.19) были однозначны. Т-лимфоциты линии А, истощенные от аллореактивных клеток, специфичных к молекулам МНС-Q, и первично иммунизированные в реципиенте $F_1(A \times Q)$, взаимодействовали только с В-лимфоцитами и макрофагами линии А, но не линии Q. В соответствии с данными ранних экспериментов по МНС-рестрикции эти Т-лимфоциты взаимодействовали с В-лимфоцитами и макрофагами $F_1(A \times Q)$, что исключает возможность остаточных аллогенных эффектов, связанных с неполным удалением

аллореактивных клеток. В качестве контроля такой же опыт ставили на Т-клетках животных F_1 , которые, как известно, содержат обе субпопуляции, рестриктированные по разным молекулам МНС. Как видно из табл. 15.19, обе субпопуляции сохраняются и при отрицательной, и при положительной

Таблица 15.19. Непримируемые Т-клетки линии А, толерантные к антигенам линии Q, не взаимодействуют с В-лимфоцитами линии Q после первичной иммунизации в реципиенте F_1 ¹⁾ (по [17])

Хелперные Т-клетки	В-лимфоциты	Анти-БЭ БОК на селезенку	
		IgM	IgG
Линии А, толерантные	Линия А	25 100	80 000
	Линия Q	0	50
	$F_1(A \times Q)$	30 000	64 400
$F_1(A \times Q)$ нормальные	Линия А	16 200	63 000
	Линия Q	6900	24 800
	$F_1(A \times Q)$	27 700	133 100

¹⁾ Клетки лимфатических узлов неиммунизированных мышей линии А или $F_1(A \times Q)$ для удаления аллореактивных клеток с помощью отрицательной селекции «филтровали» in vivo в облученных мышах $F_1(A \times Q)$ (см. рис. 15.3). Т-лимфоциты грудного лимфатического протока переносили облученным мышам F_1 , которых затем иммунизировали БЭ. Через 5 дней из грудного лимфатического протока с помощью положительной селекции получали Т-клетки и в качестве Т-хелперов переносили их другим облученным реципиентам $F_1(A \times Q)$ вместе с антигеном и В-лимфоцитами (клетки селезенки, обработанные анти-телами Thy-1 и комплементом) иммунных к БЭ мышей линий А, Q или $F_1(A \times Q)$. БОК селезенки определяли через 7 дней после переноса.

селекции. Иными словами, популяция клеток F_1 могла взаимодействовать с В-лимфоцитами и макрофагами линий А и Q при ответе на БЭ. Таким образом, в полном соответствии с данными Киндред эти результаты указывают на то, что популяция Т-клеток линии А после примирования не взаимодействует с аллогенными В-лимфоцитами и макрофагами линии Q.

Точный механизм взаимодействия аллогенных Т-клеток и В-лимфоцитов при первичном IgM-ответе неизвестен. Одна из заслуживающих внимания возможностей состоит в том, что В-лимфоциты L_yb-5 (этой популяции В-лимфоцитов не требуются рестриктированные взаимодействия; см. табл. 15.14) активируются растворимыми факторами аллогенных Т-клеток. В любом случае общий вывод, который можно сделать из всех этих работ, заключается в том, что нормальные Т-клетки не могут взаимодействовать с аллогенными В-лимфоцитами (и макрофагами) при гуморальном ответе IgG-класса и что первичная иммунизация в F_1 -микроокружении не приводит к размножению субпопуляции Т-клеток линии А, специфичных к антигену в ассоциации с молекулами МНС линии Q. Такие результаты оказываются в прямом противоречии с экспериментами, проведенными на химерных животных. В опытах с химерами было показано, что Т-клетки линии А, ставшие в результате созревания в облученных реципиентах $F_1(A \times Q)$ толерантными к антигенам линии Q, способны взаимодействовать с В-лимфоцитами и макрофагами линии Q (табл. 15.15—15.17). На языке МНС-рестрикции это означает, что химеры линии А обладают двумя субпопуляциями Т-клеток, подобно животным F_1 .

15.3.5. Адаптивная дифференцировка: онтогенетическая модель происхождения МНС-рестрикции

Решение описанного противоречия было предложено Кацем [28]. Исходная модель клеточных взаимодействий (взаимодействий подобных структур) была поставлена под сомнение опытами с химерами, так как они, по-видимому, указывали, что клетки линии А могут взаимодействовать с клетками линии Q, хотя их молекулы клеточных взаимодействий отличаются. В защиту модели клеточных взаимодействий Кац предложил концепцию адаптивной дифференцировки. Он правильно отметил, что принципиальные различия между опытами по острому истощению и с долгоживущими химерами заключались в характере той среды, в которой происходила дифференцировка Т-лимфоцитов. В последнем случае Т-клетки линии А созревают в присутствии антигенов гистосовместимости линии Q. В первом случае Т-клетки линии А первый раз контактируют с антигенами гистосовместимости линии Q на стадии истощения аллогенных клеток, за несколько дней до анализа кооперативных взаимодействий с В-лимфоцитами и макрофагами линии Q. Поэтому Кац предположил, что «процесс дифференцировки стволовой клетки и ее потомства может регулироваться молекулами гистосовместимости клеточной поверхности и такая дифференцировка может быть «адаптивной» по отношению к микроокружению, в котором она осуществляется». Другими словами, в химерных животных Т-клетки линии А «обучаются» распознавать антигены гистосовместимости линии Q. В рамках исходной модели клеточных взаимодействий такой процесс обучения сводится к индукции молекул CI линии Q на поверхности Т-клеток линии А. Индуцированная экспрессия молекул CI линии Q на Т-клетках линии А должна подчиняться правилу аллельного исключения. В модели двойной специфичности процесс обучения включает появление на Т-клетках линии А рецептора, распознающего молекулы гистосовместимости линии Q. Чтобы не противоречить результатам экспериментов с животными F_1 , Т-клетки линии А, распознающие антиген в ассоциации с молекулами МНС линии Q, должны отличаться от Т-клеток линии А, распознающих антиген в ассоциации с молекулами МНС линии А. Такое требование вытекает из исследований цитотоксических Т-лимфоцитов химер $P_1(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{обл.})$.

Концепция адаптивной дифференцировки была для того времени значительным теоретическим достижением. Ее основное положение состоит в онтогенетическом происхождении МНС-рестрикции. В соответствии с этим созревают только те Т-клетки, которые распознают молекулы МНС, представленные в организме животного в ходе дифференцировки. Это противоречит модели первичной иммунизации, которая, как обсуждалось ранее, постулирует способность Т-клеток распознавать антиген в ассоциации с молекулами МНС любого гаплотипа. Согласно модели адаптивной дифференцировки, Т-лимфоциты в норме рестриктированы только по сингенным молекулам МНС, так как только эти молекулы представлены при созревании Т-клеток. Однако в химерах создается аномальная ситуация и Т-клетки с генотипом А, несущие молекулы МНС только линии А, контактируют с молекулами гистосовместимости линии Q и «обучаются» распознавать их как свои собственные. Хотя эта ситуация и аномальна для Т-клеток линии А, ее нельзя считать нефизиологической, так как и у животных F_1 в норме созревают Т-лимфоциты, рестриктированные по двум (или трем в случае F_1 -специфических молекул МНС) типам распознаваемых молекул МНС. Наконец, хотя популяция зрелых Т-клеток химер ограничена в отношении распознаваемых молекул МНС, репертуар распознавания клеток-предшественников должен быть неограничен и способен адаптироваться к любой

молекуле *MHC*, представленной в среде дифференцировки. Таким образом, принципиальное различие моделей адаптивной дифференцировки и примирования состоит в том, что первая постулирует селективный этап отбора репертуара Т-клеточных рецепторов в онтогенезе, а последняя — нет.

15.3.6. Цитотоксические Т-лимфоциты химер

F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) преимущественно лизируют клетка-мишени, несущие молекулы *MHC* класса I мышей P_1

Первое экспериментальное подтверждение гипотезы адаптивной дифференцировки¹ получил работавший с цитотоксической системой Бивен [29]. Для изучения влияния молекул *MHC* среды, в которой происходит созревание Т-клеток, на специфичность Т-клеточного распознавания он получал химеры типа $F_1(A \times Q)(к.м.) \rightarrow P_1(обл.)$ в результате введения клеток костного мозга $F_1(A \times Q)$ облученным реципиентам родительской линии. Бивен регистрировал цитотоксический ответ против минорных антигенов гистосовместимости, белков клеточной поверхности, которые кодируются «не-*MHC*»-генами и обладают несколькими (более одной) аллельными формами. Т-клетки линии, несущей один аллель, дают *MHC*-рестриктированный ответ на второй аллель в ассоциации с молекулами *MHC* класса I в случае цитотоксических Т-лимфоцитов и в сочетании с молекулами класса II в случае индукторных Т-лимфоцитов. Для определения цитотоксического ответа *in vitro* животных первично иммунизировали *in vivo*. В экспериментах с химерами мыши, несущие минорные антигены A в сочетании с разными гаплотипами *MHC* (A.X и A.Y)¹), отвечали на минорный антиген Q двух других линий мышей (Q.X и Q.Y) с тем же самым гаплотипом *MHC* (Q.X и Q.Y). Такое сочетание линий выявляет различия приблизительно по 30 минорным антигенам гистосовместимости. Обработанные антигенами против Thy-1 и компонентом клетка костного мозга линии $F_1(A.Y \times A.X)$ (минорные антигены линии A в ассоциации с молекулами *MHC* X и Y) вводили облученным реципиентам родительской линии A.Y или A.X. Через 8 недель после пересадки костного мозга химерных животных иммунизировали клетками $F_1(Q.Y \times Q.X)$ (минорные антигены линии Q в ассоциации с молекулами *MHC* линий X и Y). Спустя 6 недель иммунные клетки селезенки химер вторично стимулировали *in vitro* при культивировании с облученными клетками селезенки $F_1(Q.Y \times Q.X)$. Спустя 5 дней определяли цитотоксическую активность популяции отвечающих клеток против Т-клеточных blast мышей линии Q.Y и Q.X.

Как видно из табл. 15.20, у нормальных мышей $F_1(A.Y \times A.X)$, иммунизированных клетками $F_1(Q.Y \times Q.X)$, генерируются цитотоксические клетки, которые одинаково лизируют как мишени Q.X, так и мишени Q.Y. В отличие от этого цитотоксические Т-клетки химер $F_1(A.Y \times A.X)(к.м.) \rightarrow A.Y(обл.)$ избирательно лизировали (приблизительно 50-кратный уровень лизиса на основании сравнения кривых доза — эффект) мишени Q.Y, несущие одинаковые с облученным реципиентом молекулы *MHC*-Y. Цитотоксические Т-клетки химер $F_1(A.Y \times A.X)(к.м.) \rightarrow A.X(обл.)$, напротив, характеризуются предпочтительным лизисом мишеней Q.X, несущих одинаковые с облученными реципиентами молекулы *MHC*-X. Было установлено, что в обоих случаях популяция отвечающих Т-клеток происходит из костного мозга доноров, так как цитотоксиче-

¹) Для простоты понимания этих экспериментов линии мышей обозначаются A. X. Первая буква обозначает минорный антиген гистосовместимости, а вторая — *MHC*-гаплотип данной линии.

Таблица 15.20. Цитотоксические Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.) рестриктированы в распознавании чужеродных антигенов молекулами МНС P_1 класса I¹⁾ (по [29])

Отвечающие Т-клетки	Специфический лизис, %	
	Q.Y	Q.X
F_1 (A.Y $\times$ A.X) нормальные	54,8	68,4
F_1 (A.Y $\times$ A.X) (к. м.) $\rightarrow$ A.Y (обл.)	61,3	8,8
F_1 (A.Y $\times$ A.X) (к. м.) $\rightarrow$ A.X (обл.)	4,8	80,5

1) Нормальных F_1 или химерных мышей иммунизировали клетками селезенки мышей F_1 (Q.Y $\times$ Q.X). Спустя 6 недель клетки селезенки мышей реципиентов стимулировали в культуре и через 5 дней определяли цитотоксическую активность этих клеток против меченных ^{51}Cr Т-клеточных бластов линии Q.X или Q.Y.

ский эффект отменяла обработка клеток как анти-МНС-Х-, так и анти-МНС-У-антителами и комплементом. Это исключает тривиальное объяснение полученных данных устойчивостью к облучению части Т-лимфоцитов реципиента, с которыми и связан цитотоксический эффект. При дифференцировке в облученном реципиенте родительской линии из популяции стволовых клеток животных F_1 созревают цитотоксические Т-лимфоциты, которые способны лизировать только клетки-мишени, экспрессирующие минорные антигены гистосовместимости и молекулы МНС реципиента. В норме популяция стволовых клеток гибридов F_1 дает Т-киллеры, способные лизировать клетки-мишени, несущие минорные антигены гистосовместимости в ассоциации с молекулами МНС обоих родителей. Другими словами, Т-клетки химер F_1 (к.м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.) рестриктированы в основном по молекулам МНС P_1 . Это исходное наблюдение довольно быстро нашло подтверждение в работах Цинкернагеля и сотрудников, использовавших другую цитотоксическую систему.

15.3.7. Гены, кодирующие молекулы МНС класса I, определяют селекцию специфичности Т-лимфоцитов в химерах F_1 (к. м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.)

Тот факт, что гены, кодирующие молекулы МНС класса I, отвечают за предпочтительное распознавание молекул МНС реципиента цитотоксическими Т-клетками химер F_1 (к.м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.), был доказан Цинкернагелем [30] с помощью мутантов H-2K. Здесь следует напомнить, что цитотоксические Т-лимфоциты мышей B6 H-2^{bm1}(bm1), инфицированных вирусом осповакцины, не способны лизировать клетки-мишени, несущие нормальный аллель K^b (например, B10.A(5R): K^bI-A^bI-E^kD^d), тогда как у мышей B6 дикого типа генерируются такие цитотоксические Т-клетки (табл. 15.8). При введении клеток костного мозга мышей F_1 (bm1 $\times$ B6) после предварительного удаления Т-лимфоцитов летально облученным мышам bm1 или B6 аллель H-2K реципиента определяет фенотип цитотоксических Т-клеток химер (табл. 15.21). Т-клетки химер F_1 (bm1 $\times$ B6)(к.м.) $\rightarrow$ B6(обл.) лизировали инфицированные вирусом мишени B10.A(5R), а Т-клетки химер F_1 (bm1 $\times$ B6)(к.м.) $\rightarrow$ bm1(обл.) не лизировали (табл. 15.21). Оба вида химер были способны генерировать цитотоксические

Таблица 15.21. Аллель K^b определяет избирательную рестрикцию цитотоксических Т-лимфоцитов химер F_1 (к. м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.) по молекулам МНС реципиента ¹⁾ (по [30])

Цитотоксические Т-клетки	% специфического высвобождения ^{51}Cr из	
	B10.A (5R) (K^bD^d)	B10.A (2R) (K^kD^b)
Нормальные B6	99	90
Нормальные bm1	6	93
F_1 (bm1 $\times$ B6) (к. м.) $\rightarrow$ B6 (обл.)	61	56
F_1 (bm1 $\times$ B6) (к. м.) $\rightarrow$ bm1 (обл.)	9	85

¹⁾ Нормальных или химерных мышей инфицировали вирусом осповакцины и спустя 6 дней определяли цитотоксическую активность клеток селезенки против меченных ^{51}Cr инфицированных вирусом мишеней B10.A(5R), несущих молекулы K^b и D^d класса I, или B10.A (2R), несущих молекулы K^k и D^b класса I.

Т-лимфоциты, которые лизировали несущие D^b молекулы клетки-мишени, инфицированные вирусом осповакцины (например, B10.A(2R): K^kI-A^k , I-E^k, D^b). Этот контроль продемонстрировал не только функциональную активность популяции химерных Т-лимфоцитов, но и выявил клональный характер селективных влияний микроокружения. Иными словами, в ходе созревания на Т-клетки, рестриктированные по молекулам H-2K и H-2D, независимо влияют, по-видимому, их собственные рестриктирующие элементы (K и D).

15.3.8. Индукторные Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.) преимущественно кооперируют с В-лимфоцитами, несущими молекулы МНС класса II P_1 -мышей

Применимость концепции адаптивной дифференцировки в отношении Т-клеток, распознающих молекулы МНС класса II, впервые удалось показать Спренту [31] в опытах на хелперных Т-лимфоцитах. Он вводил костный мозг мышей F_1 (CBA $\times$ B6) ($K^{k/b}I-A^{k/b}I-E^{k/b}D^{k/b}$), из которого предварительно были удалены Т-лимфоциты, летально облученным реципиентам каждой из родительских линий. Спустя 3—12 месяцев Т-клетки химер первично иммунизировали БЭ в облученном нормальном реципиенте F_1 . Клетки, полученные с помощью положительной селекции, собирали через грудной лимфатический проток и переносили во второго облученного реципиента F_1 вместе с антигеном (БЭ), В-лимфоцитами и макрофагами. Через 7 дней определяли число анти-БЭ БОК. Как видно из табл. 15.22, Т-клетки химер F_1 (CBA $\times$ B6)(к.м.) $\rightarrow$ $\rightarrow$ CBA(обл.) взаимодействовали при ответе на БЭ с В-лимфоцитами и макрофагами мышей B10.BR, несущими общие аллели H-2 с мышами линии CBA (реципиента), но не взаимодействовали с В-лимфоцитами мышей B10, несущими аллели H-2 другой родительской линии B6.

Обратная ситуация наблюдалась при использовании Т-клеток химер F_1 (к.м.) $\rightarrow$ B6(обл.), которые кооперировали с В-лимфоцитами и макрофагами мышей B10, но не B10.BR. Использование В-клеток и макрофагов рекомбинантной линии B10.A(4R)($K^kI-A^kI-E^bD^b$) позволило Спренту картировать в K- или I-A субобласти МНС гены, ответственные за этот феномен. С В-лимфоцитами и макрофагами мышей B10.A(4R) кооперировали Т-клетки химер

Таблица 15.22. Хелперные Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow$ P_1 (обл.) распознают чужеродные антигены в ассоциации с молекулами МНС класса II¹⁾

Донор Т-хелперов	Донор В-клеток	Аллели H-2 В-клеток				Анти-БЭ БОК/селезенка	
		K	I-A	I-E	D	IgM	IgG
F_1 (CBA $\times$ B6)	B40.BR	k	k	k	k	79 100	134 300
(к. м.) $\rightarrow$	B40	b	d	b	b	500	200
CBA (обл.)	B40.A (4R)	k	k	b	b	25 300	55 600
F_1 (CBA $\times$ B6)	B40.BR	k	k	k	k	3000	9900
(к. м.) $\rightarrow$	B40	b	b	b	b	32 000	50 500
B6 (обл.)	B40.A (4R)	k	k	b	b	0	0
Нормальные	B40.BR	k	k	k	k	53 300	126 500
F_1 (CBA $\times$ B6)	B40	b	b	b	b	27 700	42 500
	B40.A (4R)	k	k	b	b	10 800	42 300

1) Суммарную популяцию Т-клеток от нескольких доноров первично иммунизировали БЭ в облученных реципиентах F_1 (CBA $\times$ B6) и на этапе положительной селекции через 5 дней собирали лимфоциты грудного лимфатического протока. Для определения хелперной активности этих клеток использовались В-лимфоциты и макрофаги (клетки селезенки, обработанные антителами против Thy-1 и комплементом) иммунных к БЭ мышей конгенных линий на основе B10, несущих различные гаплотипы МНС. Буквами обозначены гаплотипы аллелей каждой области МНС доноров В-лимфоцитов. Бляшкообразующие клетки определяли в селезенках облученных реципиентов F_1 (CBA $\times$ B6) через 7 дней после переноса.

F_1 (к.м.) $\rightarrow$ CBA(обл.), но не Т-клетки химер F_1 (к.м.) $\rightarrow$ B6(обл.) (табл. 15.22). Этот результат свидетельствует об участии продуктов генов субобласти I-A в этом феномене. К сожалению, пока еще не удалось окончательно доказать роль молекул МНС класса II в феномене преимущественного распознавания молекул МНС реципиента. Для этого необходимо использовать экспериментальную систему на основе мутантной линии B6.CH-2^{bm12}, несущей структурную мутацию гена A_β.

Хотя описанное картирование было неточным, опыты Спрента явились важным дополнением к исследованиям, проведенным с цитотоксической системой. При поиске критического элемента микроокружения реципиента, ответственного за адаптивную дифференцировку на уровне цитотоксических Т-клеток, одно из возможных объяснений заключается в том, что АПК, индуцирующие ответ предшественников цитотоксических Т-клеток, устойчивы к облучению, т.е. в химерах представлены АПК реципиента, а не доноар F_1 . В этом случае иммунизация приводит к генерации цитотоксических Т-клеток, специфичных к антигену в ассоциации с молекулами МНС реципиента. Это означает, что популяция Т-клеток не характеризуется ограниченным репертуаром рецепторов и что наблюдаемое «МНС-предпочтение» обусловлено избирательной первичной иммунизацией.

Для того чтобы выяснить, действительно ли репертуар рецепторов неиммунной популяции Т-лимфоцитов химерных гибридов F_1 селектируется в ходе созревания в реципиенте родительской линии, следует извлечь Т-клетки из микроокружения реципиента и первично проиммунизировать в «нейтральной» среде, где нет селективных влияний АПК. Это условие было выполнено в экспериментах Спрента [31], в которых Т-клетки химер F_1 (к.м.) $\rightarrow$ P_1 , первично иммунизировали в животных F_1 . Более того, выделенные с помощью положительной селекции, Т-клетки повторно вводили нормальным мышам F_1 для анализа хелперной активности. Несмотря на это, хелперные Т-клетки были способны взаимодействовать только с В-лимфоцитами и макрофагами родитель-

ской линии, несущей молекулы МНС облученного реципиента. Таким образом, можно сделать вывод, что «ограниченное» разнообразие характерно для популяции зрелых Т-лимфоцитов химер F_1 и отражает специфичность рецепторов Т-клеток к антигену в ассоциации с молекулами МНС облученного реципиента.

15.3.9. Роль тимуса в формировании МНС-рестрикции

Если АПК не влияют на селекцию репертуара Т-клеток в химерах $F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{обл.})$, что тогда служит селектирующим элементом в организме реципиента? Ответ на этот вопрос, представляющий следующее большое достижение в этой области, опять-таки был получен в результате изучения цитотоксических Т-лимфоцитов. Цинкернагель и др. [33] постулировали, что тимус является критическим элементом в организме реципиента, ответственным за влияние на репертуар Т-лимфоцитов химерных животных. Для проверки этой гипотезы у взрослых мышей-реципиентов до облучения удаляли тимус, а затем пересаживали тимус от доноров, несущих другой гаплотип МНС. В первых экспериментах у мышей линии А удаляли тимус, подвергали рентгеновскому облучению летальной дозой (950 Р), вводили им костный мозг мышей $F_1(A \times Q)$, из которого предварительно были удалены Т-лимфоциты. Затем этим мышам пересаживали доли тимуса от 6—8-месячных мышей $F_1(A \times Q)$. Тимусы перед трансплантацией облучали, чтобы резидентные Т-клетки трансплантата после пересадки и созревания не могли попасть в кровоток. Такие химеры обозначаются $F_1(\text{тим.}) + F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{АТХ})$. Спустя 3 месяца химерных животных иммунизировали вирусом осповакцины и через 6 дней определяли цитотоксическую активность Т-клеток селезенки против инфицированных вирусом клеток родительских линий. Как следует из табл. 15.23 (опыт 1), в отличие от резуль-

Таблица 15.23. Тимус представляет собой орган реципиента, который влияет на специфичность рестрикции цитотоксических Т-лимфоцитов радиационных костномозговых химер ¹⁾ (по [32, 33])

Опыт	Донор костного мозга	Донор тимуса	Тимэктомизированный реципиент	% специфического вывода ⁵¹ Cr из инфицированных вирусом мишеней	
				А	Q
1	$F_1(A \times Q)$	$F_1(A \times Q)$	А	35	60
2	$F_1(A \times Q)$	А	$F_1(A \times Q)$	40	0
3	$F_1(A \times Q)$	Q	$F_1(A \times Q)$	3	68

¹⁾ У мышей линии А или $F_1(A \times Q)$ удаляли тимус, облучали летальной дозой и затем вводили им клетки костного мозга $F_1(A \times Q)$ без Т-лимфоцитов. Далее мышам пересаживали облученные тимусы мышей линий А, Q или $F_1(A \times Q)$. Спустя 10–12 недель химерных мышей инфицировали вирусом осповакцины и еще через 6 дней определяли цитотоксическую активность клеток селезенки против инфицированных вирусом мишеней линии А и Q.

татов, полученных с «обычными» химерами $F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{обл.})$, когда лизировались только мишени, идентичные по МНС облученному реципиенту, в этом случае наблюдался лизис мишеней обеих родительских линий. Таким образом, если тимус характеризуется F_1 -генотипом, а все остальные ткани — P_1 -генотипом, то зрелые Т-клетки отвечают так же, как и нормальные клетки F_1 .

Во втором эксперименте тимэктомированным и летально облученным реципиентам $F_1(A \times Q)$ вводили костный мозг мышей $F_1(A \times Q)$. Затем мышам подкожно пересаживали облученный (875P) тимус, полученный от мышей одного из двух родительских гаплотипов (A или Q). Эти химеры обозначаются как $P_1(\text{тим.}) + F_1(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{ATX})$. Через 3 месяца химерных животных иммунизировали вирусом осповакцины и определяли специфичные цитотоксические Т-клетки селезенки.

Как показано в табл. 15.23 (эксперименты 2 и 3), если реципиенту пересаживали тимус линии A, то цитотоксические Т-лимфоциты лизировали инфицированные вирусом мишени линии A, но не линии Q. Если же реципиенту пересаживали тимус линии Q, то цитотоксические Т-лимфоциты лизировали инфицированные вирусом мишени линии Q, но не линии A. Таким образом, если только тимус несет родительский гаплотип МНС, а все остальные ткани, включая костный мозг, — гаплотип гибрида F_1 , то цитотоксические Т-лимфоциты будут рестриктированы по молекулам МНС этого же родительского гаплотипа. Приведенные эксперименты доказывают, что тимус является местом селекции репертуара Т-лимфоцитов F_1 в химерах $F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{обл.})$.

Бивен и Финк (Bevan, Fink) продолжили эти опыты на популяциях Т-хелперов, рестриктированных по области I, а Миллер и др. [34] — на Т-клетках-эффекторах ГЗТ (гиперчувствительности замедленного типа). Результаты исследования ГЗТ представлены в табл. 15.24. У мышей $F_1(A \times Q)$ в возрасте

Таблица 15.24. Тимус представляет собой орган реципиента, который влияет на специфичность рестрикции Т-клеток — эффекторов ГЗТ в радиационных костномозговых химерах ¹⁾ (по [84])

Донор костного мозга	Донор тимуса	Тимэктомированный реципиент	Поглощение ¹²⁵ I-дезоксисуридина, Л/П	
			Линия А	Линия Q
$F_1(A \times Q)$	A	$F_1(A \times Q)$	$2,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
$F_1(A \times Q)$	Q	$F_1(A \times Q)$	$1,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$

¹⁾ Химерам $F_1(\text{к. м.}) + P_1$ или $P_2(\text{тим.}) \rightarrow F_1(\text{ATX})$ вводили циклофосфамид и затем их иммунизировали антигеном (КЛН) для индукции Т-клеток ГЗТ. Эти клетки переносили неиммунным реципиентам и определяли ГЗТ. При этом определении антиген вводили в левое ухо, правое оставалось интактным. Для промечивания активированных Т-клеток реципиентам вводили также ¹²⁵I-дезоксисуридин. Миграцию этих клеток в зону индуцированного антигеном воспаления измеряли по отношению радиоактивности, включившейся в левое (Л) ухо, и радиоактивности, включившейся в правое (П) ухо. Достоверные значения этого показателя по отношению к контролю выделены курсивом.

6 недель удаляли тимус и спустя 2 дня им пересаживали тимус новорожденных доноров родительской линии под капсулу почки. Через 2 недели мышей облучали и затем им вводили костный мозг F_1 (без Т-лимфоцитов). Через 2 месяца животных иммунизировали КЛН и затем определяли способность клеток селезенки и лимфоузлов переносить ГЗТ не примированным реципиентам мышей родительских линий. Клетки иммунизированных мышей $F_1(A \times Q)$ в норме переносят ГЗТ животным обеих родительских линий, а клетки мышей родительских линий — только сингенным реципиентам (классическая МНС-рестрикция). Как показано в табл. 15.24, клетки химер $P_1(\text{тим.}) + F_1(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{ATX})$ ведут себя подобно клеточной популяции родительской линии, а не F_1 . Если был пересажен тимус линии A, то ГЗТ эффективно переносится реципиентам линии A и плохо переносится реципиентам линии Q. При пересадке тимуса линии Q, напротив, иммунные клетки химер вызывают выраженную ГЗТ у реципиентов

линии Q и лишь слабую реакцию у реципиентов линии A. Таким образом, в соответствии с данными исследований цитотоксических Т-лимфоцитов эти эксперименты показали, что тимус определяет рестриктированный репертуар Т-клеточного распознавания.

15.3.10. Значение экспериментов с химерами

$$F_1 \text{ (к. м.)} \rightarrow P_1 \text{ (обл.)}$$

Из экспериментов с химерами $F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{обл.})$ и $P_1(\text{тим.}) + F_1(\text{к.м.}) \rightarrow F_1(\text{АТХ})$ можно сделать много выводов. Во-первых, очевидное «сужение» репертуара Т-клеток мышей F_1 , а именно распознавание антигена в ассоциации с молекулами МНС только одной родительской линии, свидетельствует о том, что этап положительной селекции осуществляется в тимусе. При этом в тимусе происходит либо размножение Т-клеток, несущих рецепторы к молекулам МНС тимуса, либо, наоборот, супрессируются все Т-клетки, не экспрессирующие такие рецепторы. В этих моделях предполагается, что созревающие Т-клетки специфичны к молекулам МНС тимуса, что дает преимущество при дифференцировке по отношению к остальным клеткам. Следует отметить, что этап положительной селекции происходит в отсутствие антигена. Это значит, что в ходе онтогенеза структуры Т-клеток, распознающие антиген, должны различать определенный набор молекул МНС в отличие от зрелых периферических Т-лимфоцитов, которые связывают и отвечают на молекулы МНС только в присутствии антигена. Эти различия между временем (в ходе дифференцировки Т-клеток) и по локализации (тимус в противоположность периферической лимфоидной системе) процесса обучения Т-клеток распознаванию «своего» и ответом Т-клеток на антиген позволили нескольким исследователям предположить, что двойное распознавание является единственной реальной моделью Т-клеточного рецептора. Другими словами, клетка сначала экспрессирует рецептор к молекулам МНС, проходит селекцию по специфичности к этим молекулам и лишь затем экспрессирует центр (сайт) связывания антигена. Однако с этими данными согласуются и односайтовые модели рецептора с разной аффинностью к молекулам МНС и антигену в сочетании с молекулами МНС.

Второй вывод, вытекающий из этих экспериментов, заключается в том, что клетки тимуса, резистентные к облучению в дозе 950Р, экспрессируют все участвующие в рестриктированном распознавании молекулы МНС (так называемые рестриктирующие элементы). Молекулы МНС, которые несут дифференцирующиеся Т-клетки, по-видимому, не существенны, так как стволовые клетки животных F_1 , созревающие в тимусе родительского происхождения, приобретают способность распознавать молекулы МНС только этой родительской линии. Поскольку молекулы МНС класса I представлены на большинстве клеток организма, их экспрессия предполагалась и в тимусе. Однако молекулы МНС класса II представлены только на некоторых лимфоидных и гемопоэтических клетках периферических органов. Следовательно, экспрессия молекул МНС класса II на ретикулоэндотелиальных и эпителиальных клетках тимуса была предсказана онтогенетической моделью МНС-рестрикции. Правильность этого предсказания была подтверждена рядом исследователей, обнаруживших молекулы Ia на эпителиальных клетках мозговой и кортикальной зон тимуса. Однако до сих пор не выявлен тип клеток тимуса, которые собственно синтезируют эти молекулы. Фактически в литературе существует лишь одна работа, которая свидетельствует о костномозговом происхождении клеток, влияющих на процесс «обучения» Т-лимфоцитов, рестриктированных по области I.

Таблица 15.25. Сводка экспериментов по острому истощению и неонатальной толерантности, в которых исследуется способность нормальной популяции Т-клеток линии А распознавать антиген в ассоциации с аллотенными молекулами МНС линии Q

Метод создания толерантности	Т-клетки	Антиген	Определение	Сингенная линия	Аллогенная линия	Распознавание алло-антигенов	Источник данных
Отрицательная селекция лимфоцитов грудного протока (ЛГП)	Хелперы	БЭ (SRBC)	Вторичное in vivo	CBA	B6	Нет	<i>Sprent, Immunol. Rev.</i> , 42, 108, 1978
Отрицательная селекция ЛГП	«	БЭ	Первичные БОК in vitro	Le	Au	Да	<i>Heber-Katz, Wilson, J. Exp. Med.</i> , 142, 928, 1975
Отрицательная селекция ЛГП	Цитотоксические	ТНФ	Первичное in vitro	DA	F	Да	<i>Wilson et al., J. exp. Med.</i> , 146, 361, 1977
Отрицательная селекция ЛГП	«	ТНФ	То же	CBA	B6	Да	<i>Wilson et al., J. Exp. Med.</i> , 146, 361, 1977
Отрицательная селекция ЛГП	«	Вирус осповакцины или гриппа	Первичное in vivo	«	B6	Нет	<i>Bennick, Doherty, J. Exp. Med.</i> , 148, 128, 1978
Отрицательная селекция ЛГП	«	Вирус осповакцины	То же	BALB или B10.D2	B6	Нет	<i>Bennick, Doherty, Nature</i> 276, 829, 1978
Отрицательная селекция ЛГП	«	То же	«	BALB	С3Н или SJL	Да	<i>Doherty, Bennick, J. exp. Med.</i> , 149, 150, 1979
Отрицательная селекция ЛГП	«	«	«	B6	B10.A (4R)	Да	<i>Doherty, Bennick, J. exp. Med.</i> , 150, 1187, 1979

БудР и свет	Пролитерирующие	ТНФ	Первичное и вторичное in vivo	13	2	Да*	<i>Thomas, Shevach, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 2164, 1977</i>
БудР и свет	Цитотоксические	«	Первичное in vitro	F ₁ (AKR×DBA/2)	B6	Нет	<i>Janeway et al., J. Exp. Med., 147, 1065, 1978</i>
БудР и свет	Пролитерирующие	поли(глютаминовая кислота-аланин)	Первичное и вторичное in vitro	30 различных комбинаций		Да	<i>Ishii et al., Nature, 295, 534, 1982</i>
Неонатальная толерантность	Хелперы	БЭ	Вторичное in vivo	AKR	BALB	Нет	<i>Kindred, Cell Immunol., 20, 241, 1975</i>
Неонатальная толерантность	Цитотоксические	Вирус оспы вакцины	Первичное in vivo	A/J A/J	A.TL B6	Нет Нет	<i>Zinkernagel et al., J. Exp. Med., 147, 897, 1978</i>
Неонатальная толерантность	«	ТНФ	Первичное in vitro	A.TL	A.AL	Да	<i>Forman et al., Immunogenetics, 5, 561, 1977</i>
Неонатальная толерантность	«	Минорные антигены гистосовместимости	Вторичное in vitro	B10.A B10.M	B10.M B10.A	Да Да	<i>Forman, Streilen, J. Exp. Med., 150, 1004, 1979</i>
Адсорбция на монослое	«	Вирус Сендай	То же	CBA	B6	Да	<i>Stockinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 7390, 1980</i>

Третьим выводом из экспериментов с химерами является независимость механизма формирования толерантности к собственным молекулам МНС от механизма формирования МНС-рестриктивного распознавания. Этот вывод вытекает из данных, что у химер $F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{обл.})$ не обнаруживается алло-реактивность на молекулы МНС у P_2 (класса I или II), хотя такие Т-клетки способны распознавать антиген только в ассоциации с молекулами МНС у P_1 . Оба события должны происходить в тимусе, но они оказываются независимыми этапами созревания Т-клеток. Вследствие этого Т-клеточный репертуар химер $F_1(\text{к.м.}) \rightarrow P_1(\text{обл.})$ уникален. В отличие от репертуара нормальных животных F_1 у химер нет субпопуляции Т-клеток, отвечающих на молекулы МНС животных P_2 . Более того, как будет ниже обсуждаться в деталях, популяция АПК химер происходит в основном из костного мозга доноров P_1 . Эти обстоятельства создают исключительную ситуацию, в которой P_1 -рестриктивная популяция Т-клеток контактирует с антигеном в окружении МНС-молекул P_1 и P_2 в отсутствие анти- P_2 -аллореактивных клеток.

Наконец, наиболее важный вывод из экспериментов с химерами — это представление о МНС-рестрикции как о приобретенном свойстве Т-лимфоцитов в ходе дифференцировки в тимусе в отсутствие антигена. Это онтогенетическое событие вызывает такое «сужение» Т-клеточного репертуара, что в ответ на антиген размножаются только клоны, специфичные к антигену в ассоциации с «выученными» (в норме — собственными) молекулами МНС. Следовательно, такая онтогенетическая модель предсказывает, что неиммунная популяция Т-клеток любой линии не может распознавать антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС (несобственный МНС). Это прямо противоположно трактовке МНС-рестрикции, предложенной теорией примирования. Модель примирования предсказывает существование клонов Т-клеток, распознающих антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС. Итак, опыты по изучению репертуара распознавания Т-клеток нормальных мышей инбредных линий стали пробным камнем двух конкурирующих теорий. К сожалению, полученные результаты оказались столь неоднозначными, что ни одна из групп исследователей не могла сделать обоснованного выбора между этими двумя моделями. В следующем разделе настоящей главы будут суммированы эти противоречивые данные.

15.4. Может ли нормальная популяция Т-лимфоцитов линии А распознавать антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС линии Q?

15.4.1. Острое истощение и неонатальная толерантность

Уже в 1972 г. было ясно, что аллогенные макрофаги могут восстанавливать антительный ответ на бараньи эритроциты (БЭ) при добавлении к популяции клеток селезенки (содержащей Т- и В-лимфоциты), из которой предварительно были удалены макрофаги. Однако из этого наблюдения отнюдь не следовало, что отвечающие Т-клетки специфичны к БЭ (SRBC) в ассоциации с аллогенными молекулами МНС. Наоборот, аллореактивные Т-клетки селезенки были способны отвечать на аллогенные молекулы МНС сами по себе. Такие аллореактивные Т-клетки могли высвобождать растворимые медиаторы, стимулирующие в сочетании с антигеном В-лимфоциты $Lyb\ 5^+$ к нерестриктивному антительному ответу. Таким образом, перед определением способности распо-

знавать антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС необходимо удалить из отвечающей популяции аллореактивные Т-клетки.

Для удаления аллореактивных клеток из нормальной популяции лимфоцитов использовался ряд методов: фильтрация клеток в облученном реципиенте F_1 с последующим дренированием грудного лимфатического протока (отрицательная селекция; см. рис. 15.3); воздействие на стимулированные клетки БУДР и светом *in vitro* (табл. 15.10); индукция неонатальной толерантности (рис. 15.6); прикрепление к клеточному монослою (рис. 15.7). Однако в некоторых экспериментах была установлена способность истощенных популяций Т-клеток распознавать антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС, а в других опытах — нет. Результаты всех этих экспериментов суммированы в табл. 15.25. В качестве иллюстрации этих с виду противоречивых данных мы обсудим опыты Бенника и Догерти [35, 36], которые, работая с одной и той же экспериментальной системой, получили и тот и другой результат.

При исследовании специфичности цитотоксических Т-клеток к вирусу осповакцины и гриппа Бенник и Догерти для индукции толерантности к антигенам $H-2^b$ (B6) «фильтровали» клетки мышей СВА ($H-2^k$) через облученных мышей F_1 (CBA $\times$ B6). Затем полученные при помощи отрицательной селекции клетки стимулировали вирусом в облученных реципиентах F_1 (CBA $\times$ B6). Как следует из табл. 15.26, в популяции Т-клеток мышей СВА, выделенной в результате отрицательной селекции, появлялись цитотоксические клетки, специфичные только к инфицированным вирусом $H-2^k$ -мишеням (сингенным), но не $H-2^b$ (аллогенным). В отличие от этого среди нормальных Т-клеток F_1

Таблица 15.26. Цитотоксические Т-клетки, специфичные к вирусу в ассоциации с аллогенными молекулами МНС, обнаруживаются у некоторых, но не у всех линий мышей ¹⁾

Опыт	Вирус	Отвечающие Т-клетки	Полученные отрицательной селекцией против молекул МНС	Специфический выход ⁵¹ Cr из мишеней, %			
				Инфицированные $H-2^k$	Неинфицированные $H-2^k$	инфицированные $H-2^b$	Неинфицированные $H-2^b$
1 [35]	Гриппа «	CBA F_1 (CBA $\times$ B6)	B6	75	4	4	0
			—	81	0	57	0
2 [36]	Осповакцины	BALB/c	C3H	Инфицированные $H-2^b/d$	Неинфицированные $H-2^b/d$	Инфицированные $H-2^k$	Неинфицированные $H-2^k$
	«	BALB/c ²⁾	C3H	48	2	72	22
	«	BALB/c	—	30	3	37	15
	«	BALB/c	—	31	0	11	8

¹⁾ В опыте 1 с целью удаления клеток, отвечающих на аллоантигены мышей B6, Т-клетки мышей СВА получали с помощью отрицательной селекции в облученных мышах F_1 (CBA $\times$ B6), а затем иммунизировали их вирусом гриппа при переносе вторым облученным реципиентам F_1 (CBA $\times$ B6). Исследовали цитотоксическую активность клеток селезенки против $H-2^k$ (сингенных) и $H-2^b$ (аллогенных) мишеней, инфицированных и неинфицированных вирусом. Иммунные клетки нормальных мышей F_1 служили контролем. В опыте 2 для удаления клеток, реактивных к аллоантигенам мышей C3H, Т-клетки мышей BALB/c получали путем отрицательной селекции в реципиентах F_1 (C3H $\times$ BALB/c), а затем иммунизировали вирусом осповакцины в облученных мышах A/J (K^kD^d). Цитотоксическую активность клеток селезенки определяли против $H-2^b/d$ (сингенных) и $H-2^k$ (аллогенных) мишеней, инфицированных и неинфицированных вирусом. Контролем служили иммунные клетки селезенки нормальных мышей BALB/c. Курсивом выделены достоверные значения уровня лизиса по сравнению с неинфицированными мишенями.

²⁾ В этой экспериментальной группе популяцию цитотоксических Т-клеток до определения обрабатывали антисывороткой против $H-2K$ и комплекментом, чтобы удалить любые радиорезистентные клетки реципиентов F_1 (C3H $\times$ BALB/c) или A/J, примесь которых можно объяснять наблюдаемым лизис.

подавлялись Т-киллеры, специфичные к инфицированным вирусом мишеням гаплотипов $H-2^k$ и $H-2^b$ (табл. 15.26). В сходных экспериментах Т-клетки мышей с гаплотипом $H-2^d$ не распознавали вирус осповакцины в ассоциации с K^b -молекулой. Эти результаты указывают, что Т-клетки, созревающие в присутствии одних молекул МНС, не способны распознавать антиген в ассоциации с другим видом молекул МНС, т. е. МНС-рестрикция является устойчивым свойством, приобретаемым в процессе онтогенеза.

Однако дальнейшие работы этих исследователей показали, что вирус распознается в сочетании с молекулами МНС некоторых гаплотипов [36] (табл. 15.26, эксперимент 2). Например, при иммунизации вирусом Т-клеток BALB/c ($H-2^d$) в облученных реципиентах A/J ($K^kI-A^kI-E^kD^d$) генерировались Т-киллеры, специфичные к вирусу осповакцины в сочетании с молекулами K^k . Из популяции Т-клеток мышей BALB/c были предварительно удалены аллореактивные клетки, специфичные к молекулам $H-2^k$, в результате негативной селекции в облученных мышах F_1 ($C3H \times BALB/c$). Обработка популяции отвечающих клеток антисывороткой против $H-2K^k$ и комплементом для удаления потенциально радиорезистентных клеток реципиента не снижала уровня цитотоксического ответа. Этот контроль продемонстрировал, что именно донорские Т-клетки BALB/c специфичны к вирусу осповакцины в ассоциации с молекулой K^k . Более того, анализ перекрестной реактивности этих цитотоксических Т-клеток показал, что они не лизируют инфицированные вирусом мишени, несущие молекулы K^d (табл. 15.27). Таким образом, субпопуляция Т-клеток, специфичная к вирусу в сочетании с аллогенными молекулами МНС, отличается от субпопуляции, специфичной к вирусу в сочетании с сингенными молекулами МНС.

Таблица 15.27. Цитотоксические Т-клетки, которые распознают антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС класса I, но не распознают тот же антиген в ассоциации с сингенными аллельными продуктами класса ¹⁾ (по [36])

Отвечающие Т-клетки	Полученные отрицательной селекцией против аллоантигенов	Специфический выход ⁵¹ Cr из мишеней, %					
		B10.A (2R) (K^kD^b)		B10.A (5R) (K^bD^d)		HTG (K^dD^b)	
		инфицированные	неинфицированные	инфицированные	неинфицированные	инфицированные	неинфицированные
BALB/c (K^dD^d)	B10.A (K^kD^d)	32	5	38	4	3	0

¹⁾ Т-клетки мышей BALB/c получили с помощью отрицательной селекции в облученных мышах B10.A, чтобы удалить клетки, реагирующие с молекулами K^k и Ia^k . Такие клетки с остроиндуцированной толерантностью сенсибилизировали вирусом осповакцины в облученных реципиентах B10.A и затем определяли цитотоксическую активность против клеток-мишеней, несущих различные аллельные формы молекул МНС класса I. Клетки BALB/c, сенсибилизированные вирусом в ассоциации с молекулами K^k и D^d , вызывали значимый лизис инфицированных вирусом мишеней (курсив), несущих (K^k (2R) и D^d (5R), но не мишеней, несущих K^d (HTG).

Два других примера отмены рестрикции по собственным молекулам МНС также были продемонстрированы этими авторами. В одном случае была обнаружена способность Т-клеток мышей $H-2^d$ распознавать вирус осповакцины в ассоциации с молекулой K^s , тогда как в другом случае Т-клетки мышей $H-2^b$ оказались способны распознавать вирус осповакцины в сочетании с молекулой K^k .

Каким методом были удалены аллореактивные клетки, как следует из табл. 15.25, значения не имеет; в некоторых экспериментах выявлены Т-клеточ-

ное распознавание и ответ на антиген в контексте аллогенных молекул МНС, а в некоторых случаях — нет. По-видимому, разница определяется в основном конкретным антигеном и гаплотипом МНС, использованными в исследовании. В общем, если такие Т-клетки выявляются, они представляют субпопуляцию, независимую от клеток, распознающих тот же самый антиген в ассоциации с собственными молекулами МНС.

15.4.2. Сравнение экспериментов с химерами F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) по острому истощению и по индукции неонатальной толерантности

Возникает вопрос: действительно ли результаты опытов по острому истощению противоречат экспериментам с химерами F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)? На этот вопрос следует ответить отрицательно. Ряд исследователей обнаружили, что у таких химер рестрикция по МНС реципиента не всегда абсолютна. Например, Блэнден и Эндрю [37] исследовали ответ цитотоксических Т-лимфоцитов у 53 индивидуальных химерных мышей F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) на вирус эктромелии в ассоциации с молекулами МНС линии P_1 или P_2 . Только у 10 животных была обнаружена рестрикция исключительно по молекулам МНС линии P_1 . Клетки остальных 43 мышей вызывали значимый лизис инфицированных вирусом мишеней и P_1 , и P_2 . При сравнении зависимости выхода ^{51}Cr от числа отвечающих клеток (кривые доза — эффект) в целом у 53 химерных животных оказалась приблизительно на порядок большая частота цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к вирусу в ассоциации с молекулами МНС линии P_1 . Таким образом, в составе Т-клеточной популяции химер преимущественно представлены Т-клетки, распознающие молекулы МНС реципиента, но при этом существуют и такие Т-клетки, которые специфичны к другим молекулам МНС. Будет ли наблюдаться абсолютная рестрикция или нет, в некоторой степени зависит и от сложности использованного антигена, т. е. иммунизация простыми молекулами, такими, как синтетические полипептиды, которые содержат мало антигенных детерминант, чаще будет приводить к появлению абсолютной рестрикции, чем иммунизация сложными антигенами, например вирусами или целым набором минорных антигенов гистосовместимости.

К исследованию частоты клеток, распознающих антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС после острого истощения аллореактивных клеток обратились совсем недавно. Для решения этой задачи целесообразнее всего использовать метод лимитирующих разведений. Такой анализ осуществили Стокинджер и др. [38]. Используемая ими техника острого истощения включала адсорбцию аллореактивных Т-клеток на монослое аллогенных клеток селезенки. При такой процедуре облученные клетки селезенки прикрепляются к пластику, и отвечающие Т-клетки затем культивируют в течение 1 ч на монослое. Неприкрепившиеся клетки получают с помощью отмывок и мягкого встряхивания. Этот метод позволяет удалять только предшественники аллореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов. Т-клетки, пролиферирующие в СКЛ (в ответ на молекулы МНС класса II), не удаляются.

Если из популяции отвечающих Т-клеток линии А удалить предшественников цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к молекулам МНС класса I линии Q, то оставшаяся популяция в ответ на стимуляцию инфицированными вирусом Сендай клетками селезенки линии Q может генерировать цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к аллогенным мишеням линии Q, модифицированным этим вирусом (рис. 15.7). Эти цитотоксические Т-клетки не лизируют сингенных клеток-мишеней линии А, инфицированных вирусом Сендай, хотя

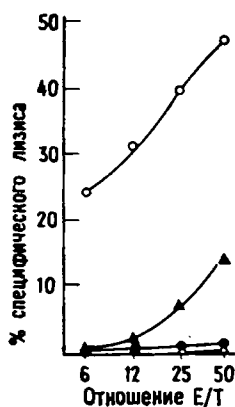


Рис. 15.7. Цитотоксические Т-клетки, специфичные к вирусу Сендай в ассоциации с аллогенными молекулами МНС. Аллореактивные цитотоксические Т-лимфоциты удаляли из популяции клеток селезенки линии А с помощью адсорбции на монослое клеток селезенки линии Q. Дальнейшая стимуляция этой популяции клетками селезенки линии Q не вызывала цитотоксического ответа (светлые треугольники), тогда как стимуляция клетками селезенки линии Q, инфицированными вирусом Сендай, вызывает сильный цитотоксический ответ на инфицированные вирусом мишени линии Q (светлые кружки), а также слабый ответ на неинфицированные мишени линии Q (темные треугольники). Эти цитотоксические Т-клетки не лизировали инфицированные вирусом мишени линии А (темные кружки). Е/Т — отношение числа эффекторных клеток к числу клеток мишеней, добавляемых в конечном счете в цитотоксический тест. (По [38].)

они лизируют в небольшой степени неинфицированные аллогенные мишени линии Q. Эти последние аллореактивные клетки невозможно было получить при непосредственной иммунизации интенсивно истощенной популяции неинфицированными аллогенными клетками селезенки линии Q. Однако их присутствие после стимуляции инфицированными вирусом клетками селезенки свидетельствует о том, что при использовании метода истощения предшественники аллореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов удаляются неполностью. Тем не менее Т-клетки, специфичные к сочетанию вируса Сендай и аллогенных молекул МНС, оказались доминантной популяцией (при сравнении кривых доза — эффект частота этих клеток была приблизительно в 10 раз выше частоты аллореактивных Т-клеток).

Именно в составе этой истощенной популяции методом предельных разведений анализировали частоту двух неперекрестных, специфичных к вирусу

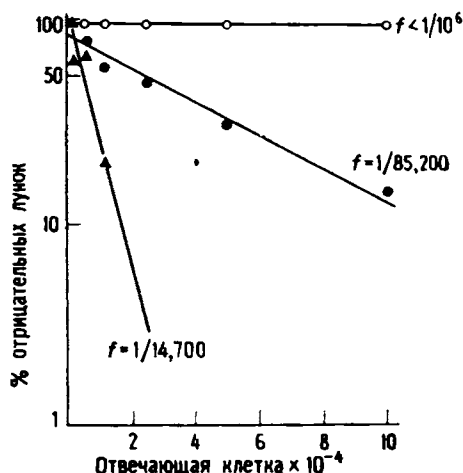


Рис. 15.8. Анализ частоты предшественников ЦТЛ методом предельных разведений. С помощью адсорбции на монослое из популяции клеток селезенки линии А удаляли аллореактивные цитотоксические клетки, специфичные к антигенам линии Q. Неприкрепившиеся клетки затем переводили в культуру. Ряд параллельных культур с небольшим (в расчете на лунку) числом отвечающих клеток стимулировали в присутствии Т-клеточных факторов роста 1) клетками селезенки линии Q (светлые кружки) 2) клетками селезенки линии Q, инфицированными вирусом Сендай (темные кружки) или 3) клетками селезенки линии А, инфицированными вирусом (темные треугольники). Через 6 дней определяли специфическую цитотоксическую активность в каждой культуральной лунке. Данные представлены как зависимость $\ln$ % отрицательных культур от числа отвечающих клеток на лунку. Частоту предшественников определяли при показателе степени, равном нулю, в вырожденном случае распределения Пуассона для редких событий. (По [38].)

Сендай субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов, одна из которых рестриктирована по сингенным молекулам МНС класса I линии А, а другая — по аллогенным молекулам МНС класса I линии Q. Как показано на рис. 15.8, частота предшественников Т-клеток с сингенной рестрикцией составляла 1/15 000; частота предшественников Т-клеток того же животного с аллогенной рестрикцией — 1/85 000. Таким образом, частота предшественников Т-лимфоцитов, рестриктированных по сингенным молекулам МНС, оказалась приблизительно в 6 раз выше. При исследовании ответа на ТНФ-модифицированные клетки в нескольких комбинациях инбредных линий, а также на инфицированные вирусом Сендай клетки селезенки это превышение варьировало от 2 до 10 раз. Подобное предпочтение собственных молекул МНС (в 3—9 раз) наблюдалось при использовании тимоцитов в качестве отвечающей популяции и ТНФ-модифицированных сингенных и аллогенных клеток в качестве стимуляторов.

Если принять во внимание неполное удаление аллореактивных Т-клеток с помощью такого метода острого истощения, а в опытах с химерами — отсутствие анализа методом предельных разведений частоты клеток-предшественников каждой из двух субпопуляций, то оценки преимущественной рестрикции Т-клеток по сингенным молекулам МНС по отношению к аллогенным, полученные с помощью этих двух подходов, достаточно близки (десятикратное превышение в опытах с химерами и шестикратное — в опытах с интенсивным истощением). Хотя необходимо провести более точные количественные эксперименты, очевидно, что два описанных методических подхода дают довольно близкие результаты.

15.4.3. Супрессия или вырожденность репертуара распознавания

Интерпретация сингенного предпочтения, установленного при анализе частоты предшественников, лежит в центре споров о происхождении МНС-рестрикции. Исследователи, проводившие опыты по острому истощению, утверждали, что большая частота Т-клеток, рестриктированных по сингенным молекулам МНС, обусловлена первичной иммунизацией и размножением популяции Т-клеток в реципиенте, в котором представлены исключительно АПК, несущие сингенные молекулы МНС. Однако это утверждение не объясняет результатов, полученных на химерах F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.), у которых через 1—2 месяца F_1 -АПК костномозгового происхождения составляют большую часть презентирующих клеток и первичная иммунизация Т-клеток при переносе второму облученному реципиенту F_1 не отменяет предпочтительного распознавания молекул МНС мышей P_1 (табл. 15.22). С другой стороны, исследователи, работавшие с костномозговыми химерами, впервые предположили, что существование Т-клеток химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.), рестриктированных по молекулам МНС реципиента P_2 (а не реципиента P_1), является методическим артефактом, связанным с трудностью полного удаления Т-лимфоцитов периферической крови из популяции клеток донорского костного мозга. Если какие-либо из этих зрелых Т-клеток, прошедших дифференцировку в тимусе F_1 ($P_1 \times P_2$), сохраняются, то в облученном реципиенте P_1 они могут дать начало популяции Т-лимфоцитов, рестриктированных по молекулам МНС мышей P_2 . Однако при такой интерпретации не принимается в расчет существование таких клеток у мышей P_1 после острого истощения аллореактивных Т-лимфоцитов.

Чтобы увязать между собой эти две группы данных (опытов с химерами и острым истощением), были предложены две различные гипотезы, каждая из которых основывалась на своем представлении о происхождении МНС-рестрикции. Исследователи, убежденные в способности популяции Т-клеток распозна-

вать любые молекулы МНС, исходили из предположения, что ограничение репертуара Т-клеточного распознавания у химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) обусловлено наличием супрессорного механизма, отменяющего ответ клеток, рестриктированных по «не-своим» молекулам («не- P_1 »). В отличие от этого исследователи, поддерживающие представление о селекции популяции Т-клеток по способности распознавать собственные молекулы МНС в ходе созревания в тимусе, предполагали, что наблюдаемое в опытах с химерами и острым истощением выявление Т-клеток, рестриктированных по молекулам МНС, «не- P_1 », связано с вырожденностью репертуара и перекрестной реактивностью Т-лимфоцитов со структурно близкими молекулами. Любому исследователю, работающему в этой области клеточной иммунологии, трудно обсуждать эти две теории беспристрастно. Поэтому, прежде чем приступить к их обсуждению, я должен признаться, что сам отдаю предпочтение второй теории [1—3]. Те читатели, которые найдут мой анализ неудовлетворительным, могут прочесть обзоры других авторов, которых больше воодушевляет первая теория [4].

15.4.4. Доказательства существования супрессии в химерах F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)

Предположение, что Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) не проходят положительной селекции в тимусе по способности распознавать собственные молекулы МНС, а скорее претерпевают отрицательную селекцию вследствие генерации супрессоров в ответ на Т-клетки, распознающие молекулы МНС «не- P_1 », защищают в основном Смит и Миллер [39], а также Блэнден и др. [40]. Были предложены две модели генерации таких супрессоров. В обоих случаях постулировалось, что причиной супрессии служит созревание в тимусе клеток, распознающих аллогенные, «не-свои» молекулы МНС. Если Т-клеточная толерантность к собственным антигенам в норме осуществляется в тимусе, то Т-клетки F_1 гибридов, созревающие в тимусе мышей P_1 , не будут контактировать с антигенами P_2 на толеризирующих клетках тимуса и у этих животных сохранятся анти- P_2 -аллореактивные Т-клетки. Если такие клетки мигрируют на периферию, то при контакте с молекулами МНС мыши P_2 они будут вызывать аутоиммунные реакции. В связи с этим постулируется существование супрессорного механизма, обеспечивающего выживание этих животных (рис. 15.9). Согласно первой модели, супрессорные клетки специфичны к рецепторам аллореактивного Т-лимфоцита, распознающего МНС-молекулы P_2 . Утверждается, что специфичность таких супрессоров достаточно вырожденна, так что распознаются все специфичные к P_2 Т-клеточные рецепторы, включая и рецепторы к молекулам P_2 , ассоциированным с антигеном. Клетки, несущие такие рецепторы, супрессируются. Согласно второй модели, супрессорные клетки специфичны к самим МНС-молекулам P_2 . Если Т-лимфоциты активируются в ответ на антигены P_2 , то эти молекулы появляются на клеточной поверхности, вероятно, в связанном с рецептором виде. Таким образом, эти молекулы могут служить антигенным мостиком, с помощью которого возникает контакт между супрессорными клетками и всеми Т-лимфоцитами, способными распознавать МНС-молекулы P_2 .

Экспериментальные доказательства существования таких супрессорных клеток у химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) носят косвенный характер. В опыте, проведенном Смит и Миллером [39] (табл. 15.28), нормальные клетки F_1 вводили химерам F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) и иммунизировали антигеном (KLH). При изучении способности таких животных развивать ГЗТ в ответ на KLH в ассоциации с макрофагами P_2 уровень ответа был не выше, чем в контроле. По-

скольку, будучи перенесены тимэктомированным облученным контрольным химерным животным F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (АТХ), клетки F_1 способны развивать вы-

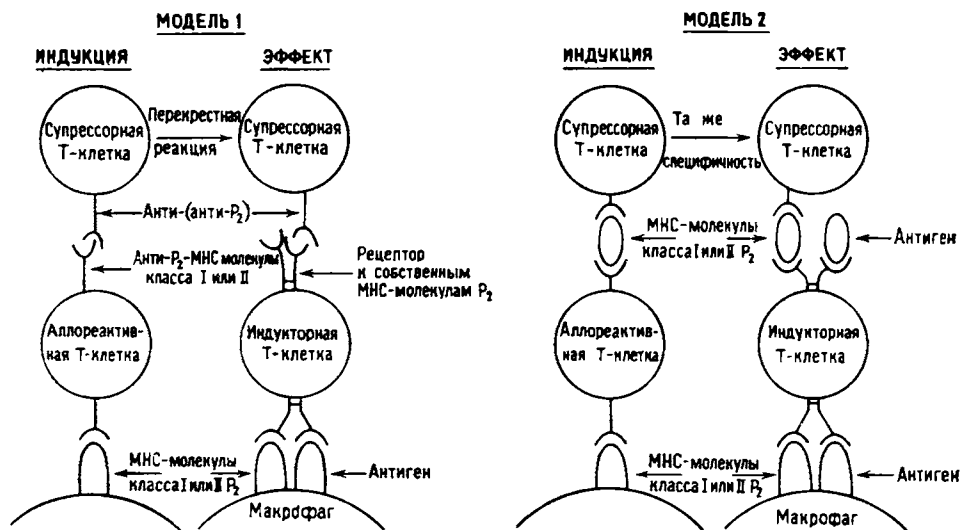


Рис. 15.9. Две супрессорные модели, объясняющие искажение репертуара Т-клеточного распознавания у химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.). Первая модель постулирует, что аллореактивные Т-клетки гибридов F_1 , специфичные к молекулам МНС линии P_2 , индуцируют супрессорные Т-клетки, специфичные к рецепторам аллореактивных клеток. Эти супрессоры перекрестно реагируют с рецепторами

индукторных Т-клеток гибридов F_1 , специфичных к антигену в ассоциации с молекулами МНС линии P_2 , и, таким образом, инактивируют их. Во второй модели эта супрессорная Т-клетка специфична непосредственно к молекуле МНС линии P_2 и подавляет любую индукторную Т-клетку, распознающую такие молекулы в ассоциации с антигеном.

раженную реакцию ГЗТ в ответ на КЛН в ассоциации с макрофагами P_2 , авторы сделали вывод, что внутренняя среда химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) подавляет эту реакцию.

Таблица 15.28. Нормальные клетки животных F_1 не отвечают на антиген в ассоциации с МНС-молекулами P_2 после переноса химерам F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)¹⁾ (по [39])

Донор Т-клеток	Неиммунизированный реципиент	Л/П включения ^{125}I -дезоксисуридина (ГЗТ)
F_1 (A $\times$ Q)	F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (АТХ)	$3,1 \pm 0,2$
Без Т-клеток	F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (АТХ)	$1,6 \pm 0,2$
F_1 (A $\times$ Q)	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	$1,7 \pm 0,2$
Без Т-клеток	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	$1,7 \pm 0,2$

¹⁾ 10^6 клеток лимфатических узлов мышей F_1 (A $\times$ Q) вводили контрольным животным F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (АТХ) или химерам F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) и стимулировали антигеном (КЛН), ассоциированным с макрофагами линии Q (P_2). Гиперчувствительность замедленного типа определяли после вторичного введения антигена в левое ухо и выражали как отношение включения ^{125}I -дезоксисуридина в левое ухо к включению в интактное правое (Л/П).

В другой работе, проведенной в лаборатории Блэндена [40], химерам F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) пересаживали кожу мышей P_2 . В значительной доле слу-

чаев эти трансплантаты отторгались. Более того, если после отторжения трансплантата клетки селезенки химерных мышей-реципиентов стимулировали *in vitro* облученными клетками P_2 , то обнаруживались цитотоксические Т-клетки, специфичные к МНС-молекулам P_2 класса I. Хотя происхождение этих цитотоксических Т-клеток (костный мозг гибрида F_1 или остаточные, устойчивые к облучению Т-клетки реципиента P_1) до конца не выяснено, эти результаты указывают, что химеры не полностью толерантны к молекулам P_2 . На основании этих данных авторы предполагают, что латентные аллореактивные Т-клетки контролируются *in vivo* неким супрессорным механизмом, который можно обойти при трансплантации кожи.

Хотя два этих опыта указывают на существование у химер определенного супрессорного механизма, все попытки прямо обнаружить супрессорные клетки у таких химер оказались неудачными. Используемый обычно подход к выявлению супрессорных клеток включает перенос облученному реципиенту F_1 смеси клеток селезенки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) и клеток селезенки нормальных животных F_1 с последующей первичной иммунизацией клеток в реципиенте F_1 . Если супрессорные клетки существуют, то они должны отменять активацию нормальных клеток F_1 антигеном в ассоциации с МНС-молекулами животного P_2 . Типичный результат такого эксперимента с Т-киллерами приведен в табл. 15.29. Клетки селезенки химер F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow A$ (обл.) не отме-

Таблица 15.29. Т-лимфоциты химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) не супрессируют нормальной активности иммунных к вирусу Т-клеток гибрида F_1 против инфицированных P_2 -мишеней при переносе смеси этих двух Т-клеточных популяций реципиенту F_1 с последующей иммунизацией ¹⁾ (по [41])

Химерные Т-клетки	Нормальные Т-клетки	Специфический выход ^{51}Cr из инфицированных мишеней, %	
		линия А	линия Q
Нет	F_1 ($A \times Q$)	62	53
F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow A$ (обл.)	Нет	45	1
F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow A$ (обл.)	F_1 ($A \times Q$)	80	75

¹⁾ Клетки мышей нормальных F_1 ($A \times Q$) и химерных F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow A$ (обл.), а также смесь этих двух популяций спленоцитов переносили облученным реципиентам F_1 ($A \times Q$), которых затем инфицировали вирусом осповакцины. Цитотоксическую активность Т-клеток селезенки определяли спустя 6 дней.

няли первичного цитотоксического ответа нормальных клеток селезенки мышей F_1 ($A \times Q$) на клетки-мишени линии Q, инфицированные вирусом осповакцины. В различных экспериментах для выявления супрессии безуспешно использовались клетки тимуса, селезенки и лимфатических узлов. Была исследована даже такая возможность: не действуют ли супрессорные клетки только на созревающие, незрелые Т-лимфоциты. Чтобы выяснить это, клетки селезенки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) переносили сублетально (500 P) и летально (950 P) облученным реципиентам F_1 , которым вводили сингенный костный мозг гибридов F_1 . При регенерации костного мозга гибридов F_1 (мышей-реципиентов в первом случае и мышей-доноров — во втором) Т-клетки, специфичные к антигену в ассоциации с молекулами МНС животного P_2 , должны быть супрессированы. Однако этого не происходило. Таким образом, предполагаемый супрессорный механизм оказалось невозможно воспроизвести и охарактеризовать вне организма химерного животного.

15.4.5. Данные о вырожденности Т-клеточного распознавания молекул МНС: измененное (абберантное) распознавание

Если результаты опытов с химерами F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) не связаны с супрессией, то как можно объяснить тот факт, что Т-клетки мышей P_1 после острого истощения аллореактивных клеток, специфичных к P_2 -антигенам, распознают многие антигены в ассоциации с МНС-молекулами мышей P_2 . Решение этого противоречия впервые предложили Догерти и Бенник [36]. Они отметили в своих работах (табл. 15.25—15.27), что популяция Т-клеток одной линии, из которой удалили аллореактивные клетки, специфичные к антигенам другой линии, способна распознавать определенный антиген в ассоциации с некоторыми, но не со всеми возможными аллогенными молекулами МНС. И наоборот, для Т-клеток другой линии имеется совершенно другой набор аллогенных молекул МНС, которые распознаются в ассоциации с тем же антигеном. Более того, Т-клетки, распознающие антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС, не распознают его в ассоциации с сингенными молекулами МНС. Другими словами, эта субпопуляция Т-клеток отлична от Т-лимфоцитов, рестриктивных по собственным молекулам МНС. Для объяснения этих наблюдений Догерти и Бенник предложили концепцию измененного (абберантного) распознавания. Эта гипотеза постулировала, что у нормальных животных функция Т-клеток, распознающих антиген в ассоциации с определенными аллогенными молекулами МНС, состоит в действительности в том, чтобы распознавать какой-то другой антиген в ассоциации с сингенными молекулами МНС. На жаргоне, который вскоре возник в литературе, эта гипотеза описывается следующим выражением:

$$\text{Собственный МНС} + X = \text{Аллогенный МНС} + Y$$

В основе этой гипотезы лежит предположение о некоторой вырожденности Т-клеточного распознавания молекул МНС. Итак, хотя и существует отбор в тимусе, селектирующий Т-клетки на основе их специфичности к собственным молекулам МНС, зрелая популяция способна распознавать аллогенные молекулы МНС в ассоциации с некоторыми антигенами. Вероятность выявления подобной перекрестной реактивности зависит от степени специфичности распознавания «своего» и сложности (числа антигенных детерминант) антигена, использованного для иммунизаций. Поскольку эта гипотеза обращается к парным взаимодействиям антигена и молекул МНС, она наиболее понятна в случае модели Т-клеточного рецептора с одним активным центром. Однако с этим представлением согласуется и модель рецептора с двумя активными центрами, если предположить физическое взаимодействие антигена и молекул МНС или аллостерические взаимодействия двух Т-клеточных рецепторов.

Данные, поддерживающие гипотезу измененного распознавания, получены в последнее время в экспериментах по Т-клеточному клонированию. Хюниг и Бивен [42] выделили клон цитотоксических Т-лимфоцитов химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.), который отвечал на минорные антигены гистосовместимости в ассоциации с молекулами МНС мышей P_1 или P_2 . Однако тщательный анализ показал, что минорный антиген (M_1), узнаваемый в ассоциации с молекулами МНС мышей P_1 (D^d), отличается от минорного антигена (M_2), распознаваемого в ассоциации с молекулами МНС мышей P_2 (K^k). Таким образом, клон распознает $M_1 + D^d$ или $M_2 + K^k$, но ни одно из двух других возможных сочетаний. Опыты по холодному торможению показали, что клон обладает большей аффинностью к комбинации M_1 с молекулой D^d реципиента P_1 (т. е. такие холодные мишени вызвали большее торможение при одной и той же

концентрации клеток), а распознавание M_2 плюс молекула K^k родителя P_2 представляет собой более слабую перекрестную реакцию.

Исследования таких клонов позволили выйти за рамки исходной гипотезы аберрантного распознавания и выдвинуть общую концепцию вырожденности Т-клеточного репертуара. Согласно этой модели, распознавание антигена в ассоциации с аллогенными молекулами МНС может быть иногда опосредовано одними и теми же клонами, специфичными к антигену в ассоциации с собственными молекулами МНС, причем эти клетки могут характеризоваться даже большей аффинностью к антигену в ассоциации с аллогенными молекулами МНС. Например, некоторые клоны Т-лимфоцитов мышей В10.А, специфичные к цитохрому *c* голубя, распознают тот же самый антиген — цитохром *c* в ассоциации с макрофагами линии В10. S (9R), но не ряда других линий [43]. В этом случае кривая зависимости ответа от дозы антигена сходна для макрофагов этих двух типов. Это можно выразить формулой

$$\text{Собственный МНС} + X = \text{Аллогенный МНС} + X$$

В другом случае Т-клеточный клон мышей В10.А (5R), специфичный к цитохрому *c* моли, лучше отвечал в присутствии макрофагов линии В10.А: кривая зависимости доза — эффект была сдвинута к более низким концентрациям антигена [44]. В этом случае можно сказать, что

$$\text{Собственный МНС} + X < \text{Аллогенный МНС} + X$$

Трудно сказать, так ли уж этот псевдоматематический жаргон помогает разобраться в сути дела. Одно лишь очевидно из опытов с клонами — это вырожденность Т-клеточного распознавания молекул МНС, что могло бы легко объяснять существование Т-лимфоцитов, специфичных к антигену в ассоциации с аллогенными молекулами МНС после селекции в тимусе Т-клеточной популяции по специфичности к собственным молекулам МНС. Таким образом, онтогенетическая гипотеза не опровергается результатами опытов по острому истощению. Однако, насколько обоснованна эта гипотеза, мы предоставляем решать читателю.

15.5. Спорные проблемы

15.5.1. Аллогенные химеры

Первые попытки Цинкернагеля и др. [54] распространить наблюдения, сделанные в опытах на химерах F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.), на аллогенные химеры P_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) не удались. Эти животные оказались не способны развивать иммунный ответ и не генерировали цитотоксических Т-клеток, специфичных к вирусу в ассоциации с P_2 -молекулами МНС класса I. Как указали Сингер и др. [46], дефект этот обусловлен тем, что аллогенные химеры не толерантны к уникальным F_1 -аллоантигенам (см. табл. 15.12). Когда Цинкернагель переносил клетки селезенки химер облученным животным F_1 , у которых представлены АПК обоих родительских гаплотипов, возникающая аллогенная реакция отменяла противовирусный цитотоксический ответ. Проведенные в дальнейшем эксперименты Догерти показали, что цитотоксические Т-клетки, специфичные к вирусу в ассоциации с P_2 -молекулами МНС класса I, можно выявить при иммунизации вирусом клеток селезенки аллогенных химер в облученном животном P_2 .

Многие исследователи в последнее время изучали аллогенные химеры и обнаружили, что они являются иммунокомпетентными [45, 46]. Основной во-

прос, который остается нерешенным до сих пор, состоит в следующем: ограничен ли Т-клеточный репертуар таких животных распознаванием антигена в ассоциации с молекулами МНС реципиента? Опубликованы работы, в которых, с одной стороны, вторичный пролиферативный ответ оказался полностью рестриктированным по молекулам МНС реципиента, а с другой — при первичном противовирусном цитотоксическом ответе выявлялись Т-клетки, специфичные в основном к молекулам МНС донорского типа (по данным анализа методом предельных разведений). При таких диаметрально противоположных данных трудно предложить читателю какую-либо общую точку зрения. Противоречия здесь настолько же серьезны, как и в работах по острому истощению аллореактивных клеток, и решение заключается, вероятно, либо в вырожденности Т-клеточного распознавания, либо в существовании супрессорного механизма у нормальных животных.

15.5.2. Бестимусные мыши

Если тимус представляет собой критический орган, влияющий на фенотип МНС-рестрикции Т-клеток, то можно было бы думать, что бестимусные (nude) мыши окажутся превосходной моделью для экспериментального подтверждения этого факта. К сожалению, эти надежды не оправдались. Киндред [47] использовала такую модель для изучения Т-клеточной дифференцировки с помощью пересадки сингенного или аллогенного тимуса (подобные животные обозначаются P_1 (тим.) $\rightarrow P_2$ (nu)). В этих опытах оба вида трансплантата вызвали созревание Т-лимфоцитов реципиента (из костного мозга бестимусных мышей). Такие созревшие Т-клетки кооперировались с В-лимфоцитами и макрофагами при генерации антительного ответа на БЭ у бестимусных животных. Этот результат оказался неожиданным, так как, согласно онтогенетической модели, в результате созревания стволовой клетки мышей «nude» в аллогенном тимусе можно думать, что зрелые Т-клетки рестриктированы только по аллогенным (P_2) молекулам МНС. В таком случае эти Т-клетки не должны взаимодействовать с В-лимфоцитами и макрофагами бестимусных мышей-реципиентов, несущих другие молекулы МНС (P_1). По сути эти бестимусные мыши должны вести себя подобно аллогенным костномозговым радиационным химерам.

При анализе этих данных, во-первых, не ясно, отличается ли на самом деле модель бестимусных животных от аллогенных костномозговых химер. Последние не дают первичного антительного ответа *in vitro* на БЭ, однако после первичной иммунизации *in vivo* наблюдается выраженный вторичный ответ прямым и непрямым БОК. Возможно, что небольшая часть из популяции Т-клеточных клонов с вырожденной специфичностью, прошедших селекцию на молекулах МНС тимуса и все же способных распознавать БЭ в ассоциации с молекулами МНС бестимусного реципиента, размножается в результате гипериммунизации (три введения с недельным интервалом). Именно эти клоны обуславливают хелперную активность, необходимую для образования антител.

Однако такая возможность исключена, поскольку Киндред [47] выделила зрелые Т-клетки из тимусных химер P_1 (тим.) $\rightarrow P_2$ (nu) и определила специфичность рестрикции этих клеток при первичной иммунизации в бестимусных мышцах P_1 или P_2 . При такой постановке эксперимента устранялись любые селективные влияния со стороны АПК, что позволило четко определять две возможные Т-клеточные популяции, одна из которых рестриктирована по молекулам МНС донора P_1 , а другая — по молекулам МНС реципиента P_2 . Как показано в табл. 15.30, были выявлены только Т-клетки, рестриктированные по

Таблица 15.30. У тимусных химер А (тим.) $\rightarrow$ Q (nu) не генерируются Т-лимфоциты, способные распознавать антиген в ассоциации с молекулами МНС линии А¹) (по [47])

Донор Т-клеток	Иммунизируемый реципиент	Число ответивших животных	Титр антител ($\lg^{-2}$)	
			Ig M	Ig G
А (тим.) $\rightarrow$ Q (nu)	Линия А Линия Q	0/6 5/5	— 6,4	— 0
Q (тим.) $\rightarrow$ Q (nu)	Линия А Линия Q	0/7 4/7	— 2,7	— 4,8

¹) Бестимусным мышам пересаживали тимус и через 6 недель выделяли клетки селезенки, которые обрабатывали антисывороткой к молекулам МНС линии А и комплементом. Такие клетки переносили бестимусным мышам линии А или Q. Этих животных иммунизировали БЭ и после вторичной стимуляции определяли титр агглютинирующих антител.

молекулам МНС реципиента P_2 . В этих опытах Т-клетки бестимусных мышей линии Q, которым был пересажен тимус от мышей линии А, обрабатывали антителами к молекулам МНС линии А и комплементом для удаления Т-клеток, перенесенных вместе с трансплантатом тимуса. Затем эти клетки переносили бестимусным мышам линии Q, которых дважды иммунизировали антигеном (БЭ). Амплитуда зарегистрированного ответа IgM-антител оказалась сравнимой с хелперным ответом Т-клеток в сингенном Q (тим.) $\rightarrow$ Q (nu) контроле (табл. 15.30). Ответ не наблюдался при введении клеток химер обоих видов облученным реципиентам животного линии А. Следовательно, Т-клеточная популяция химер А (тим.) $\rightarrow$ Q (nu), по-видимому, не способна распознавать молекулы МНС пересаженного тимуса (P_1). Этот результат прямо противоположен данным, полученным с радиационными костномозговыми химерами, когда Т-клетки распознают молекулы МНС мыши P_1 (донора тимуса) при первичной иммунизации в присутствии соответствующих АПК.

Интересно, что при анализе бестимусных мышей, которые являются аналогом химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.), результаты в этих двух системах полностью согласуются. В этом случае бестимусным мышам F_1 пересаживали тимус родительской линии, иммунизировали БЭ и определяли хелперную активность *in vitro* при ответе БОК и в системе адоптивного переноса *in vivo*. Данные, полученные Хедриком и Уотсоном [48] в исследованиях *in vivo*, представлены на рис. 15.10. Т-клетки химер А (тим.) $\rightarrow F_1$ (А $\times$ Q) (nu) индуцировали БОК в ответ на БЭ при взаимодействии с В-лимфоцитами и макрофагами линии А, но не линии Q. Т-клетки Q (тим.) $\rightarrow F_1$ (А $\times$ Q) (nu) давали противоположный результат: хелперный ответ при взаимодействии с В-лимфоцитами и макрофагами линии Q но не линии А. Происхождение отвечающих клеток от реципиентов F_1 было установлено путем отмены хелперного ответа животных Q (тим.) $\rightarrow F_1$ (А $\times$ Q) (nu) (обработкой клеток антителами против МНС-А и комплементом) и хелперного ответа животных А (тим.) $\rightarrow F_1$ (А $\times$ Q) (nu) — (обработкой антителами против МНС-Q и комплементом). Следовательно, Т-клеточный репертуар животных P_1 (тим.) $\rightarrow F_1$ (nu), по-видимому, ограничен распознаванием антигена в ассоциации с молекулами МНС тимуса мыши P_1 .

Все эти наблюдения были подтверждены Цинкернагелем и сотрудниками, исследовавшими вирус-специфические цитотоксические Т-лимфоциты. Однако результаты Киндред [47] не согласуются с данными, полученными недавно Сингером и др. [49]. Эти авторы получили химеры P_1 (тим.) $\rightarrow P_2$ (пу) и через 8—12 недель после подкожной пересадки долей тимуса новорожденных мышей определяли первичный ответ БОК на БЭ или ТНФ-КЛН. Как видно из рис. 15.11, А, при образовании БОК в ответ на БЭ Т-клетки селезенки химер А (тим.) $\rightarrow Q$ (пу) кооперировались с В-лимфоцитами и макрофагами линии А,

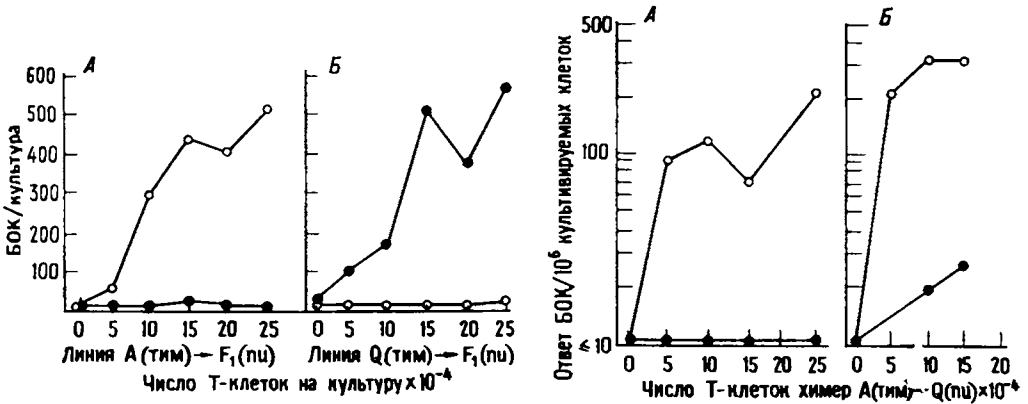


Рис. 15.10. Химеры P_1 (тим.) $\rightarrow F_1$ (пу) распознают антиген только в ассоциации с молекулами МНС линии P_1 . Т-клетки тимусных химер А (тим.) $\rightarrow F_1$ (А $\times$ Q) (пу) или Q (тим.) $\rightarrow F_1$ (А $\times$ Q) (пу) (Б) примировали и повторно стимулировали ЭБ, бараньими эритроцитами, затем определяли их хелперную активность *in vitro* по отношению к В-лимфоцитам и макрофагам (клеткам селезенки, обработанным антителами к Thy-1 и комплементом) линии А (светлые кружки) или линии Q (темные кружки). Спустя 4 дня оценивался ответ прямых БОК. (По [48].)

Рис. 15.11. Т-клетки химер А (тим.) $\rightarrow Q$ (пу) распознают антиген в ассоциации с молекулами МНС линии А, но не линии Q. Разное число Т-клеток селезенки химер А (тим.) $\rightarrow Q$ (пу) добавляли к В-лимфоцитам и макрофагам (клеткам селезенки, обработанным антителами к Thy-1 и комплементом) линии А (светлые кружки) или линии Q (темные кружки). Прямые БОК определяли через 5 дней. А. Результаты с использованием необработанных Т-клеток. Б. Результаты с Т-клетками, обработанными моноклональными антителами против молекул МНС класса I линии А и комплементом для удаления любой примеси Т-клеток линии А, которые могли быть перенесены с трансплантатом тимуса. (По [49].)

но не Q. Предварительная обработка этих клеток моноклональными антителами к молекулам МНС линии А и комплементом для удаления остаточных донорских Т-клеток тимуса не влияла на результаты (рис. 11, Б). Следовательно, в отличие от результатов, полученных в опытах Киндред, популяция Т-клеток способна распознавать антиген в ассоциации с молекулами МНС тимуса и, по-видимому, не содержит хелперных Т-клеток со специфичностью к антигену в ассоциации с молекулами МНС бестимульного реципиента. В сходном исследовании определяли специфичность предшественников цитотоксических Т-клеток тимуса и селезенки к ТНФ-модифицированным клеткам селезенки. В этих опытах клетки селезенки F_1 (тим.) $\rightarrow P_1$ (пу) были способны распознавать модифицированные ТНФ клетки мишени P_2 и P_1 .

В целом данные, полученные в лаборатории Сингера, полностью согласуются с онтогенетической гипотезой происхождения МНС-рестрикции.

Почему в разных лабораториях получаются столь различные результаты? Это пока не ясно. Однако одна из проблем, возникающих при использовании бестимусных животных, заключается в том, что у этих животных и без пересадки тимуса все же существуют клетки, несущие маркер Thy-1. Частота таких клеток невелика (1—5%), но, по-видимому, увеличивается с возрастом или под действием иммунологического стимула — такого, например, как вирусная инфекция. Число этих клеток можно увеличить в условиях эксперимента с помощью тимусного гормона, фактора роста Т-клеток (TCGF) или реакции трансплантат против хозяина. Эти воздействия позволяют оценить специфичность таких клеток. При изучении цитотоксических Т-лимфоцитов, индуцированных фактором роста Т-клеток, несколько групп исследователей обнаружили относительно высокую частоту аллореактивных клеток, специфичных к чужеродным молекулам МНС. Например, Мариански и др. [50] установили, что в случае более старых мышей nu/nu C57BL/6, у которых 5,6% клеток селезенки были Thy-1-положительными, по данным анализа методом лимитирующих разведений приблизительно 1 из 1000 клеток оказалась цитотоксичной к клеткам мышей DBA/2, несущим молекулы H-2^d. В отличие от этого у нормальных мышей C57BL/6 частота клеток с той же специфичностью составляла 1/150. Хюниг и Бивен [51] обнаружили также цитотоксические Т-клетки, специфичные к ТНФ-модифицированным клеткам селезенки. Однако не было найдено Т-клеток, специфичных к вирусу или минорным антигенам гистосовместимости. Тот факт, что эти специфичности не выявляются, вероятно, просто отражает их более низкую частоту в популяции Т-клеток, а не полное их отсутствие.

Почти во всех случаях клетки бестимусных мышей, которые опосредовали обнаруживаемые Т-клеточные функции, можно было удалить обработкой антителами против Thy-1 и комплементом. Из этого следует, что и до индукции фактором роста Т-клеток у этих животных существуют функциональные Т-лимфоциты. Где возникают эти клетки? Одна возможность заключается в том, что в период эмбрионального развития они переходят через плаценту матери. Эта гипотеза была опровергнута в опытах с бестимусными мышами F₁, в которых с помощью обработки цитотоксическими антителами против МНС и комплементом была выявлена экспрессия материнских и отцовских молекул МНС на эффекторных Т-клетках. Вторая возможность заключается в том, что клетки созревают в рудименте тимуса у бестимусных мышей еще до того, как происходит инволюция органа. Нормальный тимус развивается из клеток четырех различных источников приблизительно на 12-й день после оплодотворения. Эпителий происходит частично из энтодермы и частично из эктодермы третьего жаберного кармана и жаберной щели соответственно. Мезенхима происходит из жаберной дуги, а лимфоциты и макрофаги берут свое начало от мигрирующей стволовой клетки крови. У бестимусных мышей не происходит нормального развития эктодермы из жаберной щели. Однако эпителий энтодермального происхождения образуется и может функционировать, хотя лимфоидные элементы и не обнаруживаются в рудименте тимуса. Интересно, что, исследуя экспрессию молекул МНС на клетках эпителия тимуса, Дженкинсон и др. [52] обнаружили, что в рудименте тимуса у мышей «nude» нет молекул МНС класса II, хотя молекулы МНС класса I сохранялись. Таким образом, вполне возможно, что небольшое число Т-лимфоцитов, рестриктированных по молекулам гистосовместимости класса I, может созревать в рудименте тимуса и давать начало популяции периферических «внетимусных» цитотоксических Т-клеток, которые и были обнаружены многими исследователями. Существует, однако, и третья возможность, которая заключается в том, что эти Т-клетки на самом деле дифференцируются из стволовых клеток костного мозга в отсутствие тимуса. Шайд

и др. [53] показали, что у протимоцитов предопределены функция и экспрессия Т-клеточных маркеров и требуется только сигнал для запуска программы дифференцировки. Постулируется, что в норме этим сигналом служит тимусный гормон, но его могут имитировать такие чужеродные вещества, как эндотоксин или полинуклеотиды. Итак, согласно этой схеме, Т-клетки бестимусных мышей возникают вследствие аномальной дифференцировки под действием стимулов внешней среды. Различия в распознавании бестимусных и нормальных мышей, описанные выше, согласуются с этой моделью.

Во всяком случае, в экспериментах на бестимусных мышцах получен ряд противоречивых результатов, которые трудно суммировать в общем виде. Эти противоречия частично могут быть связаны с обнаруженными у мышей «nude» «внетимусными» Т-лимфоцитами, но в то же самое время эти клетки позволяют проникнуть в суть Т-клеточной дифференцировки в отсутствие тимуса. Тем не менее данные по пересадке бестимусным мышам тимуса родительской линии воспроизводятся в ряде лабораторий в различных антигенных системах, и эти результаты полностью подтверждают данные экспериментов с радиационными костномозговыми химерами. Поскольку ограниченный Т-клеточный репертуар в экспериментальных моделях дифференцировки стволовой клетки F_1 в тимусе P_1 является принципиальным фактом, лежащим в основе онтогенетической гипотезы происхождения МНС-рестрикции, видимо, следует сделать вывод, что опыты с бестимусными мышами свидетельствуют в пользу этого наблюдения. Однако остается спорным, свидетельствуют ли эти данные в пользу этапа положительной селекции Т-клеток в тимусе или существования механизма гаплотип-специфической супрессии, который работает только у химерных животных.

15.6. Роль антиген-презентирующих клеток

В исходных исследованиях специфичности цитотоксических Т-лимфоцитов у химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) большинству исследователей удалось показать, что Т-клетки линии P_1 способны распознавать вирус- или ТНФ-модифицированные клеточные структуры в ассоциации с молекулами МНС линии P_2 . Однако в дальнейших экспериментах Цинкернагель и др. [54] обнаружили, что это не всегда так. Если химеры P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) конструировались с использованием мышей линий C57BL/6 и А, то генерации таких клеток не наблюдалось (табл. 15.31). Химерные мыши А (к. м.) $\rightarrow F_1$ (B6 $\times$ А) (обл.), которых через 3 месяца иммунизировали вирусом осповакцины, генерировали Т-клетки, способные лизировать инфицированные вирусом мишени линии А, но не линии B6. Сходным образом химеры B6 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (B6 $\times$ А) (обл.) генерировали Т-клетки, способные лизировать инфицированные вирусом мишени линии B6, но не линии А. На первый взгляд эти результаты указывают, что у этих конкретных химерных мышей не происходит адаптивной дифференцировки. Однако Цинкернагель и др. показали, что это не так, поскольку при переносе клеток селезенки или лимфатических узлов от химерных животных недавно облученным (850 Р) животным F_1 (B6 $\times$ А), которые до облучения были инфицированы вирусом осповакцины, индуцированные цитотоксические Т-лимфоциты лизировали инфицированные вирусом мишени как линии А, так и линии B6 (табл. 15.31). Таким образом, Т-клетки химерных животных способны распознавать молекулы МНС животных P_2 (А или B6). Тем не менее есть еще что-то такое, что отсутствует у этих химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.).

Этот отсутствующий компонент должен быть представлен у недавно облученных животных F_1 и утрачен у долгоживущих радиационных химер. По-

Таблица 15.31. Иммунизация в реципиенте F_1 необходима для распознавания МНС-молекул P_2 Т-лимфоцитами химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)¹⁾ (по [54])

Т-клетки	Иммунизируемое животное	% специфического выхода ^{51}Cr из инфицированных вирусом	
		мишеней А	мишеней В6
A (к. м.) $\rightarrow$ $\rightarrow F_1 (B6 \times A)$ (обл.)	A (к. м.) $\rightarrow$ $\rightarrow F_1 (B6 \times A)$ (обл.)	21	0
A (к. м.) $\rightarrow$ $\rightarrow F_1 (B6 \times A)$ (обл.)	$F_1 (B6 \times A)$	34	19
B6 (к. м.) $\rightarrow$ $\rightarrow F_1 (B6 \times A)$ (обл.)	B6 (к. м.) $\rightarrow$ $\rightarrow F_1 (B6 \times A)$ (обл.)	0	23
B6 (к. м.) $\rightarrow$ $\rightarrow F_1 (B6 \times A)$ (обл.)	$F_1 (B6 \times A)$	40	29

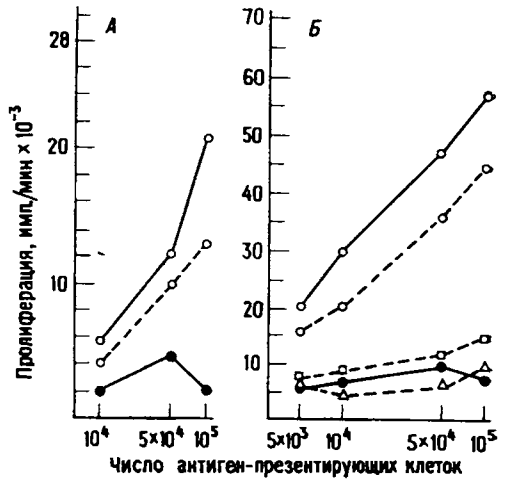
1) Через 3 месяца после получения химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) иммунизировали, либо непосредственно инфицируя вирусом осповакцины, либо путем переноса клеток селезенки и лимфатических узлов химер свежееоблученным, инфицированным вирусом осповакцины реципиентам $F_1 (B6 \times A)$. Цитотоксическую активность Т-клеток селезенки против инфицированных вирусом мишеней линии А и В6 определяли через 6 дней.

сколько соматическими клетками химер типа «не- F_1 » являются исключительно те клетки, которые гибнут в результате облучения и замещаются стволовыми клетками костного мозга родительской линии, Цинкернагель и др. [54] предположили, что от потомства этих гемопоэтических стволовых клеток зависит иммуногенность вируса. Мы рассматриваем эти клетки как АПК. Как известно, в случае Т-клеток, рестриктированных по молекулам МНС класса II (например, Т-хелперов), АПК относятся к макрофаг-моноцитарному ряду (см. гл. 5). В случае Т-клеток, рестриктированных по молекулам МНС класса I (цитотоксические Т-клетки), природа АПК неизвестна.

Тщательное изучение обновления АПК после летального облучения было проведено при исследовании Т-клеток, рестриктированных по молекулам МНС класса II. Кац и сотр. [61] первыми показали, что хелперные Т-клетки химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.), по-видимому, кооперируют только с В-лимфоцитами и макрофагами P_1 -гаплотипа в том случае, если химеры были первично иммунизированы антигеном до забора Т-лимфоцитов, т. е. если Т-клетки были первично активированы в присутствии АПК из костного мозга доноров P_1 . Однако Спрент и фон Бёмер [26], осуществившие перенос Т-клеток химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) свежееоблученным реципиентам F_1 до их иммунизации, показали, что эти клетки в действительности способны распознавать молекулы МНС линии P_2 . В этом случае представлены АПК F_1 -происхождения и, следовательно, активировались обе субпопуляции Т-клеток, каждая из которых распознает антиген в ассоциации с молекулами МНС одного из родителей, при этом были установлены кооперативные взаимодействия с В-лимфоцитами, экспрессирующими соответствующие молекулы МНС. Читатель должен вспомнить, что этого не происходило в опытах, когда Спрент [31] иммунизировал Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) после переноса свежееоблученным реципиентам F_1 (табл. 15.22). В этом случае тимус ограничивал Т-клеточный репертуар распознаванием антигена только в ассоциации с МНС-молекулами P_1 . Таким образом, присутствие F_1 -АПК не может компенсировать дифференцировочные ограничения, определяемые тимусом.

Первые эксперименты по точной оценке скорости обновления АПК у этих химер выполнили Лонго и Шварц [55] с помощью метода антиген-специфической пролиферации Т-лимфоцитов. В этом исследовании клетки селезенки химер использовали в качестве источника АПК и инкубировали с растворимым антигеном (ДНФ-ОА) в течение 1 ч. Несвязавшийся антиген отмывали и такие нагруженные антигеном клетки после облучения в дозе 1000 рад (для отмены собственной пролиферации) использовали для индукции Т-клеточного пролиферативного ответа. В опыте, представленном на рис. 15.12, А, отвечающие Т-клетки

Рис. 15.12. Обмен антиген-презентирующих клеток в селезенках аллогенных химер. А. Примированные антигеном (ДНФ-ОА) Т-клетки были повторно стимулированы нагруженными антигеном сингенными облученными клетками селезенки линии А (АПК) (светлые кружки, непрерывная линия), аллогенными АПК линии Q (темные кружки) или АПК химерных животных А (к. м.) → Q (обл.), взятых на 4-й день после трансплантации костного мозга (светлые кружки, прерывистая линия). Б. Примированные антигеном Т-клетки линии А были стимулированы сингенными, нагруженными антигеном клетками селезенки, взятыми на различные сроки после облучения *in vivo*: облученные *in vitro* (светлые кружки, сплошная линия), через 2 ч после облучения *in vivo* (светлые кружки, прерывистая линия), через 1 сутки *in vivo* (светлые квадраты), через 4 дня *in vivo* (светлые треугольники), аллогенные АПК линии Q, облученные *in vitro* (темные кружки). (По [55].)



линии А стимулировали нагруженными антигеном клетками селезенки химер А (к. м.) → Q (обл.) через 4 дня после введения костного мозга линии А облученным реципиентам линии Q. Нормальные Т-клетки отвечали на нагруженные антигеном клетки селезенки химер, хотя и не так эффективно, как на контрольные сингенные клетки селезенки линии А. Этот результат показал, что уже на 4-й день в селезенке химер представлены АПК МНС-гаплотипа донора костного мозга. На рис. 15.12, Б продемонстрирована способность клеток селезенки облученных, но не замещенных донорским костным мозгом мышей линии А презентировать антиген иммунным Т-клеткам линии А. В этом опыте оценивалось исчезновение АПК реципиента после облучения. На 4-й день клетки селезенки линии А презентировали антиген не лучше, чем аллогенные клетки селезенки линии Q. Даже через 2 ч после облучения отмечалось снижение активности антиген-презентирующих клеток. Таким образом, в течение первой недели после облучения АПК реципиента исчезают из селезенки и замещаются АПК из донорского костного мозга.

Сходные результаты были получены и для АПК брюшной полости. Однако когда исследователи приступили к изучению определенных тканей, таких, например, как кожа, то обмен АПК оказался значительно более медленным. Наиболее информативным из подобных опытов было исследование Спрента [56] по обновлению АПК, вовлеченных в стимуляцию хелперных Т-клеток *in vivo*. В этом опыте химеры P₁ (к. м.) → F₁ (обл.) использовались как реципиенты, в которых происходила положительная селекция хелперных Т-клеток гибридов F₁, специфичных к БЭ (метод см. рис. 15.3, результаты — табл. 15.32).

Таблица 15.32. Изменение способности презентировать антиген хелперным Т-лимфоцитам *in vivo* у химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)¹⁾

Повторно облученные химеры, использованные для положительной селекции Т-лимфоцитов F_1 ($A \times Q$)	Время после облучения	В-лимфоциты и макрофаги	IgG анти-БЭ БОК	Отношение А/Q
Нормальные F_1 (нехи-мерные)	—	A Q	54 400 41 100	1,32
Нормальные А (нехимер-ные)	—	A Q	83 610 3330	25,11
Нормальные Q (нехимер-ные)	—	A Q	4960 77 810	0,06
Q (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)	12 мес	A Q	6110 96 350	0,06
Q (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)	4 нед	A Q	47 240 60 850	0,78
Q (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)	6 нед	A Q	13 160 54 610	0,25
Q (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)	15 нед	A Q	7600 68 220	0,11

¹⁾ Облученные нормальные или повторно облученные химерные P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) животные были использованы как источник антиген-презентирующих клеток для первичной иммунизации БЭ нормальных Т-клеток гибридов F_1 . Затем определили хелперную активность этих иммунных клеток по отношению к В-лимфоцитам и макрофагам (обработанные антителами против Thy-1 и комплементом клетки селезенки) линии А и линии Q. Определяли уровень ответа непрямого (IgG) БОК и вычисляли отношение числа БОК при кооперации с В-лимфоцитами и макрофагами линии А и линии Q (последняя колонка).

Химерных мышей повторно облучали (850 Р) через различные сроки после введения костного мозга, а затем им вводили Т-клетки мышей F_1 и антиген. Спустя 5 дней получали Т-клетки из грудного лимфатического протока и определяли хелперную активность по отношению к В-лимфоцитам (и макрофагам) линий P_1 и P_2 .

Как видно из табл. 15.32, нормальные Т-клетки F_1 ($A \times Q$) с одинаковой эффективностью кооперировали с В-лимфоцитами линий А и Q. В отличие от этого Т-клетки гибридов F_1 , которые иммунизировали в 12-месячных химерах-реципиентах Q (к. м.) $\rightarrow F_1$ ($A \times Q$) (обл.), преимущественно взаимодействовали с В-лимфоцитами линии Q (отношение 0,06). Этот результат неотличим от данных, полученных с использованием нормальных мышей линии Q в качестве иммунизируемого реципиента, и свидетельствует о том, что все АПК однолетних (12-месячных) химер представлены клетками донора линии Q. Кинетические исследования выявили постепенный обмен клеток, при котором АПК реципиентов F_1 за 3—4 месяца замещаются АПК донорской линии Q. Таким образом, в отличие от органов, подобных селезенке, где оборот (обновление) АПК оказался очень быстрым, во многих частях тела оборот АПК происходит более медленно. Тем не менее во время проведения большинства функциональных исследований радиационных химер (3 месяца) подавляющее большинство АПК представлено клетками, происходящими из костного мозга донора.

Однако те случаи, когда оборот АПК не завершался к моменту исследования, возможно, объясняют расхождение данных экспериментов с химерами P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.). Такие факторы, как доза облучения и линейные различия, могли влиять на скорость оборота АПК. Это позволило выявить рас-

познавание МНС-молекул линии P_2 (расширенный репертуар) в некоторых случаях, когда во время иммунизации присутствовало достаточно АПК гибридов F_1 . Следует отметить, что вся эта проблема вообще снимается при определении первичного ответа *in vitro*, как, например, при цитотоксическом тесте на ТНФ-модифицированных клетках селезенки, поскольку здесь АПК каждого гаплотипа представлены во время сенсибилизации, и, следовательно, результаты анализа не зависят от АПК облученного реципиента. Подобным образом можно преодолеть проблему АПК химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) даже при вторичном ответе, вводя АПК от F_1 или P_2 (т. е. облученные клетки селезенки) на сроках иммунизации и во время рестимуляции *in vitro*. С помощью таких манипуляций едва ли не всем исследователям, даже при иммунизации химер, удалось показать, что популяция клеток химер P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) способна распознавать антиген в окружении МНС-молекул P_1 и P_2 .

Одна современная гипотеза, появившаяся в результате исследований скорости оборота АПК, заключается в предположении, что клетка, которая «обучает» Т-лимфоциты МНС-рестрикции, происходит из костного мозга, а не из тимуса. Оборот клеток тимуса, которые презентируют антиген пролиферирующим Т-клеткам, был исследован в тимусе химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) и P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.). Как было установлено, оборот АПК занимал от 2 до 4 месяцев. Если для удаления зрелых Т-клеток из периферических лимфоидных органов химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) ввести анти timoцитарную сыворотку (АТС) и кортизон-ацетат в момент, когда периферические Т-клетки химер рестриктированы по молекулам МНС реципиента P_1 , а тимические АПК заменены экспрессирующими МНС-клетками гибридов F_1 , то новое поколение Т-клеток, созревшее впоследствии, не будет рестриктировано исключительно по МНС-молекулам P_1 . Наоборот, они будут вести себя подобно Т-клеткам гибридов F_1 . Эта корреляция между типом АПК костномозгового происхождения, присутствующих в тимусе, и специфичностью рестрикции Т-клеточной популяции, мигрирующей на периферию, указывает, что клетка костномозгового происхождения может быть саморестриктирующей или самообучающейся клеткой. Дальнейшие эксперименты Лонго и Дэвиса по изучению влияния дозы облучения на оборот тимусных АПК подтверждают эту гипотезу. Облучение реципиентов P_1 в высокой дозе (1200 рад) приводило к появлению в тимусе АПК гибридов F_1 уже через 3 недели после облучения. В этом случае Т-клетки химер рестриктированы не только по молекулам МНС реципиента P_1 . Однако попытки Цинкернагеля [58] распространить эти наблюдения на системы цитотоксических Т-лимфоцитов оказались неудачными. При этом химеры F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) сохраняли фенотипическую рестрикцию по молекулам МНС реципиента P_1 даже после удаления зрелых Т-клеток с помощью АТС и (или) кортизон-ацетата. Эти результаты не обязательно противоречат данным опытов с использованием пролиферирующих Т-клеток, поскольку клетка, рестриктирующая ответ по молекулам МНС класса I, может быть тимусного происхождения, а клетка, рестриктирующая ответ по молекулам МНС класса II, — костномозгового происхождения.

15.7. МНС-рестриктированные взаимодействия Т-лимфоцитов

Согласно существующему общему представлению, индукторные Т-клетки распознают антиген в ассоциации с определенными молекулами МНС класса II на поверхности макрофага, активируются и затем передают хелперный сигнал

В-лимфоцитам, распознавая те же самые молекулы МНС класса II в ассоциации с антигеном, связавшимся с иммуноглобулиновым рецептором на поверхности В-лимфоцита (см. рис. 15.4). Но В-лимфоциты и макрофаги не единственные клетки иммунной системы, с которыми взаимодействуют индукторные Т-клетки. Существуют данные, убедительно свидетельствующие о взаимодействии различных Т-клеточных субпопуляций (супрессоров, хелперов, киллеров) друг с другом при подавлении или усилении иммунного ответа. Эти взаимодействия часто включают сложную последовательность событий, протекающих с участием более одного типа клеток. Как обсуждается в гл. 18, некоторые из Т-Т-взаимодействий рестриктированы по продуктам генов МНС.

Наиболее ярким доказательством МНС-рестриктированных Т-Т-взаимодействий служат исследования супрессорных Т-лимфоцитов, проведенные Тадой и Окумурой [59]. Эксперименты по изучению этой системы рассматриваются

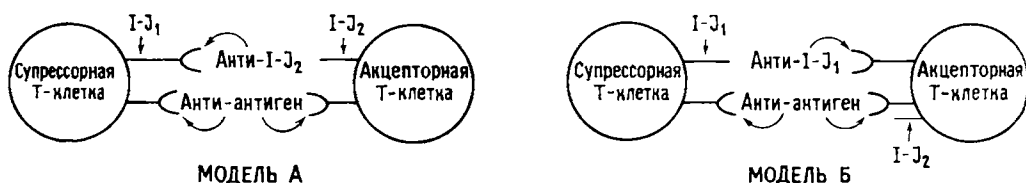


Рис. 15.13. Две модели МНС-рестриктированных взаимодействий супрессорных Т-клеток и акцепторных клеток.

А. Модель клеточных взаимодействий, предложенная Тадой. Супрессирующая клетка несет два рецептора, один специфичен к антигену, другой специфичен к молекулам $I-J_2$ на акцепторной клетке. Этот второй рецептор экспрессирует детерминанты $I-J_1$. Детерминанты $I-J_1$ и $I-J_2$ кодируются в МНС.

Б. Альтернативная модель. Акцепторная Т-клетка несет два рецептора, ни один из которых не кодируется в МНС. Один из этих рецепторов распознает антиген, другой — молекулу $I-J_1$ супрессорной Т-клетки. Молекула $I-J_2$ на акцепторной Т-клетке ассоциирована с рецептором к антигену, но не обладает какой-либо специфичностью распознавания.

в гл. 18. На основании полученных данных Тада и Окумура постулировали, что МНС-рестриктированные взаимодействия осуществляются в результате комплементарных рецептор-акцепторных взаимодействий аналогично исходной модели клеточных взаимодействий Каца (рис. 15.13, А). Согласно этой модели, геном кодирует набор рецептор-акцепторных пар ($I-J_2$ распознается молекулами $I-J_1$, которые обладают анти- $I-J_2$ -специфичностью). Во время дифференцировки пара рецептор — акцептор экспрессируется неспецифически, что приводит к образованию структур клеточных взаимодействий Т-супрессоров данного индивида. Однако, как обсуждалось ранее в этой главе, результаты опытов с гибридами F_1 и радиационными химерами ставят под сомнение этот тип модели Т-В-взаимодействий. До настоящего времени не проводилось таких экспериментов с этой моделью супрессии. Однако предварительные эксперименты Флуда и др. [60], использовавших близкую систему супрессии ответа на БЭ, свидетельствуют о том, что рестрикция супрессоров представляет собой свойство, приобретаемое в ходе дифференцировки в тимусе. Таким образом, эффекторные Т-супрессоры $Lyt-1^-$, 2^+ линии А, которые подавляют акцепторные клетки $Lyt-1^+$, 2^- линии А, но не линии Q, способны подавить ответ Т-клеток линии Q, если стволовые клетки линии А проходят дифференцировку в реципиенте F_1 ($A \times Q$), т. е. в химерах P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.). Более того, у бес-тимусных мышей линии Q с пересаженным тимусом мышей F_1 ($A \times Q$), т. е. у химер F_1 (тим) $\rightarrow P_1$ (nu), обнаружена сходная способность Т-клеточной

популяции взаимодействовать с Т-клетками обоих родительских гаплотипов. Эти результаты указывают, что тимус определяет специфичность рестрикции Т-Т-взаимодействий.

В таком случае рестриктированные взаимодействия супрессорных Т-клеток с акцепторными Т-клетками должны быть опосредованы рецепторами акцепторных Т-клеток. Модель таких взаимодействий представлена на рис. 15.13, Б. Здесь рецепторная структура акцепторной Т-клетки состоит из трех компонентов, антиген-специфического рецептора, рецептора, специфичного к детерминантам I-J на Т-супрессорах (I-J₁), и собственных молекул I-J (I-J₂) клетки. Последний компонент должен быть ассоциирован с рецепторным комплексом, так как антитела против I-J блокируют связывание фактора Т-супрессоров с акцепторной клеткой. Таким образом, рестриктированные взаимодействия контролируются молекулой I-J₁, которая входит в состав супрессорного фактора, не вследствие ее распознающей способности, а благодаря тому, что молекула I-J₁ является объектом специфического распознавания. Если это аллель-специфическое распознавание определяется в тимусе, то клетки, «обучающиеся» в этом органе, должны также экспрессировать молекулы I-J₁.

В настоящее время модель, приведенная на рис. 15.13, Б, кажется крайне спекулятивной. Эта модель приводится лишь в связи с необходимостью еще раз напомнить читателю о том, что в клеточных взаимодействиях участвуют два компонента. Итак, не всегда ясно, какая структура является распознаваемой, какая распознающей и в каком направлении идет передача сигнала.

Во всех основных супрессорных системах, описанных к настоящему времени, обнаружена рестрикция по крайней мере одного из этапов Т-Т-взаимодействий. В большинстве случаев в рестрикции участвуют продукты генов субобласти I-J. Однако в одном случае — в случае супрессорных клеток, индуцированных в реакции смешанной культуры лимфоцитов, — в рестрикции участвуют продукты генов субобласти I-C. Кроме каскада супрессорных взаимодействий установлено, что хелперные реакции и ГЗТ также включают этапы МНС-рестриктированных взаимодействий. В этих случаях гены, определяющие рестрикцию, картируются в субобласти I-A. В отношении Т-клеток-усилителей («энхансеров»), действующих в каскаде хелперных взаимодействий, показано, что полученный из клеток растворимый фактор несет молекулы, кодируемые в субобласти I-A, но отличающиеся от поверхностных молекул I-A В-лимфоцитов и макрофагов. Таким образом, МНС включает в себя семейство генов, каждый из которых кодирует молекулы, участвующие во взаимодействии специфических клеток при определенных иммунологических процессах.

Наконец, читателю следует учитывать тот факт, что в некоторых иммунологических системах получены данные о рестрикции определенных Т-Т-взаимодействий по продуктам локуса, тесно сцепленного с *Igh*-комплексом тяжелых цепей иммуноглобулинов в хромосоме 12 мышей. В наиболее изученной системе Т-клеточной супрессии ответа на БЭ, описанной Флудом и др. [60], первая клетка супрессорного каскада, Т-супрессор—индуктор *Lyt-1*⁺, 2⁻, взаимодействует со второй клеткой каскада, Т-акцептором *Lyt-1*⁺, 2⁺, только в том случае, если эти две клетки получены от линий мышей, несущих общий локус генов *V_H*. Взаимосвязь между этими рестриктированными взаимодействиями и взаимодействиями, в которых участвуют молекулы МНС, в настоящее время не ясна. Однако будущее за этой проблемой, так как близкое сходство биологических функций двух систем, вероятно, не случайно.

15.8. Является ли распознавание В-лимфоцитов МНС-рестриктированным?

Во всех исследованиях, которые обсуждались до сих пор, Т-лимфоцит выступает как клетка с двойной специфичностью к антигену и молекуле МНС. Для большинства иммунологов это согласуется с передачей иммунологической информации от макрофага к Т-лимфоцитам, а затем к В-лимфоцитам. При этом Т-клетки играют определяющую роль благодаря способности распознавать молекулы МНС класса II и на макрофагах, и на В-лимфоцитах. Согласно этой схеме, В-лимфоциты распознают только антиген, но не молекулы МНС. Однако в последнее время несколько лабораторий опубликовали работы, указывающие, что распознавание В-лимфоцитов при определенных условиях также может быть МНС-рестриктированным. Этот вопрос является в настоящее время одним из наиболее противоречивых, и я только кратко изложу некоторые опыты, чтобы познакомить читателя с этой областью клеточной иммунологии.

В ходе изучения химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) Кац и др. [61] показали, что Т-клетки таких химер, примированных KLH, не давали кооперативного ответа IgG БОК на ДНФ-KLH при взаимодействии с примированными ДНФ-белком *Ascaris suum* В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.), хотя эти Т-клетки кооперировали с В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) или F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.). Основываясь на этих исходных данных, авторы поставили эксперимент, приведенный в табл. 15.33. Используемый ими экспериментальный

Таблица 15.33. Адаптивная дифференцировка В-лимфоцитов¹ (по [61])

Хелперные Т-клетки, примированные KLH	В-клетки, примированные ДНФ	Анти-ДНФ IgG БОК в % от F_1 -контроля
F_1 P_1 P_2	F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.) F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)	100 (5194) 130 92
F_1 P_1 P_2	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	100 (1655) 112 20
F_1 P_1 P_2	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.)	100 (1829) 35 120

¹) Схема ответа идентична показанной на рис. 13.1, с той лишь разницей, что используются В-лимфоциты химер F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.), F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) и F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.). Бляшкообразующие клетки (БОК) определяли в селезенке через 7 дней после стимуляции ДНФ-KLH. Данные представлены как процент от ответа, полученного при использовании Т-клеток гибридов F_1 . Действительное число БОК, принимаемое за 100%, указано в скобках.

подход представляет собой тот же самый метод адоптивного переноса, который был ранее использован для выявления МНС-рестрикции хелперных Т-клеток (рис. 15.1). Т-клетки мышей F_1 , P_1 и P_2 , примированных KLH, облучали для отмены аллогенных эффектов и вводили облученным реципиентам F_1 вместе с В-лимфоцитами (обработанные антителами против Thy-1 и комплементом)

различных химер, иммунных к ДНФ-белкам *Ascaris suum*. Затем клетки в облученных реципиентах F_1 стимулировали ДНФ-КЛН.

7 дней спустя определяли IgG БОК. Все три популяции Т-клеток с одинаковой эффективностью взаимодействовали с контрольными В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.). Однако с В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) кооперировали Т-клетки мышей F_1 и P_1 , но не P_2 , тогда как с В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) кооперировали Т-клетки мышей F_1 и P_2 , но не P_1 . Во всех случаях отвечающие В-лимфоциты имели F_1 -фенотип, так как они происходили из костного мозга химерных животных. Отсюда Кац и др. заключили, что В-лимфоциты прошли адаптивную дифференцировку при созревании в химерном микроокружении F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) или P_2 (обл.), так что они преимущественно взаимодействовали с хелперными Т-клетками родительских линий мышей того же МНС-гаплотипа, что и у облученного химерного животного-реципиента.

Последующие эксперименты Спрента и Брюса [62], однако, не подтвердили эти наблюдения. Как видно из табл. 15.34, Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow$

Таблица 15.34. Отсутствие адаптивной дифференцировки В-клеток ¹⁾ (по [62])

Донор Т-лимфоцитов	Донор В-лимфоцитов	Анти-ЭБ БОК	
		IgM	IgG
F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	P_1	11 800	50 800
	P_2	0	0
	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$	10 400	94 400
	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$	8800	134 000
F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.)	P_1	500	900
	P_2	9800	21 700
	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$	6400	98 500
	F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$	8200	90 600

¹⁾ Химерные Т-клетки примировали ЭБ в облученном реципиенте F_1 , затем смешивали с примированными В-лимфоцитами нормальных или химерных животных и повторно иммунизировали ЭБ в облученном реципиенте F_1 . Ответ прямых и непрямых БОК селезенки определяли через 7 дней.

$\rightarrow P_1$ (обл.), примированные БЭ в нормальном реципиенте F_1 , эффективно взаимодействовали с примированными БЭ В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) и F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.). Таким образом, способность В-лимфоцитов к кооперативным взаимодействиям, по-видимому, не ограничивается фенотипом микроокружения химер, в котором происходит созревание клеток. В отличие от этого, как было описано ранее, кооперативная способность Т-лимфоцитов ограничена: Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) взаимодействуют только с В-лимфоцитами P_1 , но не P_2 , а Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) — с В-лимфоцитами P_2 , но не P_1 . Сходные результаты были получены с двумя различными типами нормальных Т-клеток при анализе кооперации с В-лимфоцитами химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) или P_2 (обл.).

Наиболее убедительный эксперимент, свидетельствующий в пользу адаптивной дифференцировки В-лимфоцитов, провели Сингер и Хоудс [63]. При изучении ответа на ТНФ-фиколл в условиях, в которых Т-клетки не нужны для акти-

вазии В-лимфоцитов, они обнаружили, что В-лимфоциты аллогенных химер P_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (к. м.) отвечают только на антиген, презентированный на облученных макрофагах P_2 (МНС гаплотипа облученного реципиента). Дефект ответа В-лимфоцитов химер на ТНФ-фиколл в ассоциации с молекулами МНС донора (P_1) не компенсируется добавлением нормальных гибридов Т-клеток F_1 , что свидетельствует о рестрикции на уровне В-лимфоцитов. Принципиальный опыт, демонстрирующий измененное В-клеточное распознавание у химер, приведен в табл. 15.35. Нормальные В-лимфоциты смешивали в культуре с химерными В-лимфоцитами и стимулировали ТНФ-фиколлом. Можно было различать два типа В-клеток, поскольку использовали нормальные В-лимфоциты гибридов F_1 , полученных в результате скрещивания родительской линии P_1 с рекомбинантной линией P_1 , отличающейся только по областям D и Ila . Следовательно, нормальные В-лимфоциты можно было удалить обработкой антителами против H-2D и комплементом. Данные, приведенные в табл. 15.35, свидетельствуют

Таблица 15.35. Нормальные В-лимфоциты и В-лимфоциты химер P_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) по-разному отвечают на ТНФ-фиколл в одной культуре ¹⁾ (по [63])

Отвечающие клетки селезенки	Анти-ТНФ БОК	
	только комплемент	Антитела против D^b + комплемент
1. Нормальные B10.A	726	750
2. Нормальные F_1 (B10.A $\times$ 2R)	618	18
3. F_1 (B10.A $\times$ 2R) + B10.A	702	351
4. F_1 (B10.A $\times$ 2R) + B10.A (к. м.) $\rightarrow$ B10 (обл.)	438	18

¹⁾ Клетки селезенки нормальных мышей B10.A и F_1 (B10.A $\times$ B10.A (2R)) отвечают на ТНФ-фиколл. Эти отвечающие клетки можно разделить с помощью обработки антителами против H-2D^b и комплементом, что приводит к удалению клеток F_1 (вторая строка), но не B10.A (1-я строка) животных. При смешивании нормальных клеток B10.A и F_1 (B10.A $\times$ 2R) мышей в соотношении 1 : 1 оба типа В-лимфоцитов в равной степени участвуют в ответе на ТНФ-фиколл (3-строка). Однако, если В-лимфоциты нормальных мышей F_1 (B10.A $\times$ 2R) смешивали с В-лимфоцитами химерных мышей B10.A (к. м.) $\rightarrow$ B10 (обл.), то отвечали только клетки гибридов F_1 (4-я строка).

о том, что в одной и той же культуре нормальные В-лимфоциты отвечают, а В-лимфоциты химер не отвечают на ТНФ-фиколл. Исходя из результатов этого эксперимента, авторы сделали вывод, что потенциал распознавания В-лимфоцитов химер изменился в результате дифференцировки в облученном реципиенте P_2 и поэтому эти В-клетки не могут распознавать молекулы МНС класса II родителя P_1 . Это означает, что по крайней мере некоторые субпопуляции В-лимфоцитов характеризуются МНС-рестриктированным распознаванием антигена.

Концепция рестриктированного распознавания В-лимфоцитов является запрещенной темой для многих клеточных иммунологов. Это связано с двумя причинами. Одна заключается в том, что клеточные взаимодействия, по-видимому, являются однонаправленными — Т-клетки передают хелперный сигнал В-лимфоцитам и стимулируют образование антител. Поскольку на уровне клонов убедительно показано наличие двойного распознавания у Т-лимфоцитов при таких взаимодействиях, то кажется расточительным, чтобы В-клетки также обладали распознающим механизмом с двойным узнаванием. Вторая причина связана с тем фактом, что молекулы антител связывают антиген в отсутствие

молекул МНС. Поскольку принято считать, что антиген-связывающий центр антител отражает специфичность рецептора В-клеток, то существует убеждение, что В-клеточное распознавание не может быть рестриктированным.

Однако интересные опыты, выполненные недавно Уайли и др. [64], свидетельствуют о том, что антитела, определяемые обычно в сыворотке, могут быть лишь верхней частью «айсберга ответа В-клеток». Используя в качестве иммуногена инфицированные вирусом гриппа сингенные клетки, а не свободный вирус, они обнаружили, что приблизительно 58% индуцированных антител связывались только с инфицированными нормальными или опухолевыми клетками, но не с выделенным вирионом. Тщательный анализ тонкой специфичности этих антител показал, что они специфичны к молекулам МНС класса I в сочетании с вирусом, т. е. для связывания антител требовалась экспрессия обеих молекул на поверхности клетки. Приблизительно 80% этих антител можно было считать МНС-рестриктированными по отсутствию связывания с антигеном на аллогенных клетках. Отсюда ясно, что по крайней мере часть В-клеточной популяции, специфичной к данному антигену, можно назвать МНС-рестриктированной. Остается исследовать, насколько выражен этот феномен при обычных способах иммунизации. Тем не менее такой эксперимент показывает, что отказ от концепции МНС-рестрикции в применении к В-клеточному распознаванию, основанный на специфичности антител, безусловно неоправдан. Подобные опыты свидетельствуют, что эта область клеточной иммунологии станет одной из тех, которые привлекут внимание в течение ближайших нескольких лет.

15.9. Аллореактивность

15.9.1. Высокая частота аллореактивных Т-лимфоцитов

Высокая частота лимфоидных клеток, которые распознают молекулы гистосовместимости других особей вида, кодируемые в МНС (сильные антигены), была обнаружена на ранних этапах развития клеточной иммунологии. В этих опытах исследовали реакцию «трансплантат против хозяина» у цыплят, используя два подхода. В первом случае различное число зрелых лейкоцитов наносили на хориоаллантоисную мембрану 10—12-дневных эмбрионов и через 4 дня подсчитывали образование очагов поражения (оспин). Во втором случае внутренне вводили лейкоциты и определяли увеличение селезенки спустя 4—5 дней. При этом у некоторых реципиентов даже 50 клеток давали ответ. В отличие от этого требовалось значительно больше клеток для индукции ответа, если донор лейкоцитов и иммунологически незрелый реципиент различались только по минорным (слабым) локусам гистосовместимости. В табл. 15.36 представлена ранняя попытка Симонсена [65] количественно оценить эти различия у мышей, сравнивая число зрелых лимфоидных клеток, необходимых для двукратного увеличения селезенки новорожденного реципиента F_1 . Если реципиент F_1 отличался от донорских СЗН-клеток ($H-2^k$) по всему МНС-локусу, а также по многим не-МНС локусам гистосовместимости F_1 (СЗН $\times$ DBA/2) ($H-2^k \times H-2^d$) и F_1 (СЗН $\times$ ST/A) ($H-2^k \times H-2^b$), то для двукратного увеличения селезенки реципиента требовалось приблизительно $2,6 \times 10^6$ клеток. В отличие от этого для такого же увеличения селезенки мышей F_1 (СЗН $\times$ AKR) ($H-2^k \times H-2^k$) требовалось 168×10^6 клеток. В этом случае различались только минорные локусы гистосовместимости. Это (50—100)-кратное различие в реактивности можно было значительно уменьшить путем иммунизаций доноров лейкоцитов

Таблица 15.36. Количественная оценка аллореактивных клеток в реакции «трансплантат против хозяина»¹⁾ (по [65])

Чужеродный антиген		Число клеток мышей СЗН, которое дает селезеночный индекс $2 (\times 10^{-6})$	
Н-2	не-Н-2	нормальные	иммунные
d	DBA/2	1,5	0,8
b	ST/A	3,7	0,7
a	A	45	2,5
(k)	AKR	168	2,5

¹⁾ Новорожденным мышам F₁, полученным скрещиванием животных линии СЗН (Н-2^k) и приведенных в таблице линий, вводили различное число зрелых лимфоидных клеток СЗН для определения количества клеток, вызывающих двукратное увеличение селезенки новорожденных. В одной группе опытов использовались клетки нормальных, неиммунизированных доноров СЗН. В другой группе использовались клетки мышей СЗН, многократно иммунизированных клетками другой родительской линии.

соответствующими F₁-клетками селезенки. Тогда резко возрастала частота клеток, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости (в 67 раз), а частота клеток, специфичных к МНС- и не-МНС-антигенам, увеличивалась незначительно (в 2—5 раз).

Эти результаты и аналогичные им данные, полученные в других лабораториях, первоначально интерпретировались как свидетельство того, что иммунная система каким-то образом сенсibilизирована к антигенам МНС. Однако последующие исследования безмикробных животных дали те же результаты, показавшие, что высокая частота аллореактивных клеток характерна для несенсибилизированного статуса животных. На этом основании некоторые исследователи делали вывод о несостоятельности теории клональной селекции. Они утверждали, что, если для 1—2% клеток задано распознавание определенного аллогенного МНС-гаплотипа и если существует 50 независимых гаплотипов (вполне разумная оценка, основанная на известном полиморфизме этой генетической области у нескольких видов животных), то весь репертуар Т-клеток должен быть ограничен лишь аллораспознаванием той или иной формы МНС. Следовательно, любая клетка, которая отвечает на другой тип антигена, такой, как минорный антиген гистосовместимости, должна обладать специфичностью по меньшей мере к двум антигенам, минорному антигену гистосовместимости и антигену главного комплекса гистосовместимости.

Хотя этот анализ не устарел и сегодня, проблема заключается в том, что большинство исследователей в то время рассматривали МНС-антиген как обычный сильный чужеродный антиген. Следовательно, они ожидали, что другие молекулы также индуцируют антиген-специфические клетки с высокой частотой и что каждая лимфоидная клетка обладает множеством антиген-специфических рецепторов. Однако это оказалось не так, поскольку в настоящее время установлена уникальность молекул МНС в этом отношении. Один из решающих экспериментов, однозначно показавший эту особенность, был выполнен Пэйном и Яффе [66]. Эти авторы исследовали реакцию трансплантат против хозяина у цыплят, определяя увеличение селезенки. Они обнаружили, что лейкоциты различных взрослых особей одного вида (аллогенные) дают реакцию, тогда как 10-кратный избыток лейкоцитов особей других видов (ксеногенных) не давал реакции. Главным исключением из наблюдений этого

рода является другой вид птиц отряда Galliformes, к которому относятся и домашние куры. Среди этой группы существует значительная вариация в эффективности индукции спленомегалии донорскими клетками, но интересно, что наиболее эффективный индуктор спленомегалии, банкинский петух, является прямым предком домашних кур. Эти опыты свидетельствуют о том, что частота лимфоидных клеток, специфичных к антигенам МНС других особей того же вида, значительно выше, чем частота клеток, специфичных к антигенам МНС других видов, т. е. частота таких клеток резко снижается с увеличением филогенетического расстояния между донором лимфоцитов и эмбрионом кур. Это наблюдение является исключением из обычной закономерности филогенетического расстояния, когда с увеличением эволюционной дивергенции двух гомологичных белков увеличивается число аминокислотных замен и, следовательно, растет число возможных антигенных детерминант; это в свою очередь приводит к большей иммуногенности данного белка у животного, несущего второй белок, в качестве «своей» молекулы. Создается впечатление, что лимфоидные клетки, наоборот, несут особые рецепторы, специфически распознающие аллогенные молекулы МНС, и что филогенетическое расхождение ведет к утрате реактивности этих рецепторов. Рассуждения такого рода привели Эрне [68] к предположению, что молекулы МНС играют ключевую роль в развитии репертуара иммунологического распознавания.

Позже ряд исследователей провели точное определение частоты клеток, опосредующих различные типы аллогенных реакций. В случае реакции «трансплантат против хозяина» Форд (Ford) оценил число лимфоцитов из грудного лимфатического протока крыс родительской линии, которые задерживаются в селезенке реципиентов F_1 и затем начинают пролиферировать. Для двух комбинаций различных линий крыс доля клеток, специфичных к антигенам гистосовместимости другой линии, составила 6% от всей популяции клеток. Используя совершенно другой подход, Бинц и Вигзелл (Binz, Wigzell) получили антисыворотку, специфичную к рецепторам аллореактивных клеток крыс. С помощью непрямого анализа, включающего радиоавтографию и иммунофлуоресценцию, эти авторы обнаружили, что 6% нормальных Т-лимфоцитов селезенки и лимфатических узлов крыс несут такие рецепторы.

Наконец, тщательное количественное исследование аллореактивности было выполнено с использованием анализа *in vitro*, например в реакции смешанной культуры лимфоцитов, результаты которой определяли в условиях лимитирующих разведений клеток. Если клетки селезенки одной линии мышей (отвечающие клетки) смешивали с облученными аллогенными клетками селезенки другой линии мышей (клетки-стимуляторы), то индуцировалась пролиферация Т-клеток первой популяции на антигены МНС второй популяции. Частоту отвечающих клеток можно определить, культивируя различное число отвечающих клеток с постоянным, большим количеством клеток-стимуляторов. Такие культуры ставятся в большом количестве параллельных проб, и для каждой дозы отвечающих клеток определяется число повторов, дающих положительный ответ. Если ответ определяется одним типом клеток, то распределение отвечающих клеток описывается распределением Пуассона для вероятности редких событий:

$$P(k; \mu f) = \frac{(\mu f)^k e^{-\mu f}}{k!},$$

где μ — число клеток на культуральную лунку, f — частота отвечающих клеток и k — число отвечающих клеток в культуре. Вероятность отсутствия ответа задается этим уравнением при $k=0$, т. е. когда в лунке нет отвечающих клеток. Отсюда вытекает: доля отрицательных лунок $P(0; \mu f) = e^{-\mu f}$. Зависимость

логарифма доли отрицательных лунок от числа клеток на лунку (μ) описывается прямой линией, наклон которой представляет отрицательную величину частоты отвечающих клеток (f) и которая должна пересекать 1 (все луны отрицательные, $\mu = 0$). Искомую частоту можно также получить из обратного значения числа клеток, которое дает 37% отрицательных лунок, поскольку если $f = 1/\mu$, то $P = e^{-1} = 0,37$.

На рис. 15.14 представлены экспериментальные результаты анализа методом предельных разведений популяции клеток селезенки мышей C57BL/6 ($H-2^b$), отвечающей на облученные клетки селезенки мышей DBA/2 ($H-2^d$) [67].

Одна из 290 клеток селезенки C57BL/6 пролиферировала в ответ на аллоантигены мышей DBA/2. Если учесть, что в нормальной селезенке мыши Т-лим-

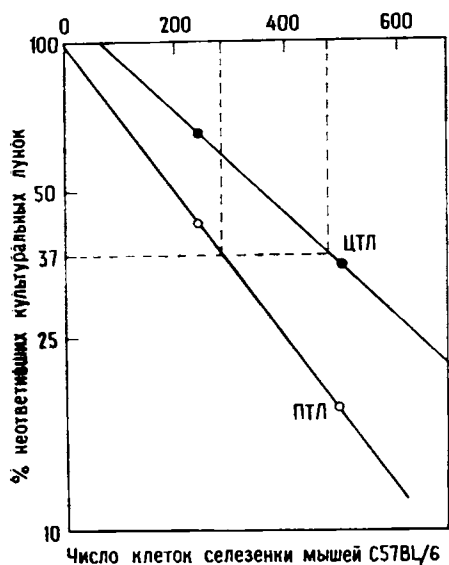


Рис. 15.14. Сравнение частоты предшественников аллореактивных пролиферирующих (ПТЛ) и цитотоксических (ЦТЛ) Т-лимфоцитов.

Клетки селезенки мышей C57BL/6 помещали в культуральные пластинки по 250 или 500 клеток на лунку. Каждая группа состояла из 40 параллельных микрокультур, стимулированных облученными клетками селезенки мышей DBA/2 (по $1 \cdot 10^6$ клеток на лунку). Через 7 дней отбирали аликваты из каждой культуры и отдельно определяли пролиферативный ответ по включению ^3H -тимидина (светлые кружки) и цитотоксичность против меченных ^{51}Cr опухолевых клеток-мишеней DBA/2 (темные кружки). Микрокультуры оценивали как отвечающие или неответающие и в логарифмической шкале строили зависимость доли (%) неответающих лунок от числа добавленных клеток селезенки мышей C57BL/6.

Прерывистыми линиями показана оценка частоты предшественников, основанная на распределении Пуассона (37% отрицательных лунок). (По [67].)

фоциты составляют 30%, то на долю отвечающих Т-клеток приходится 1,1%. Одновременно определяли и частоту цитотоксических Т-клеток, специфичных к аллоантигенам класса 1 мышей DBA/2 (рис. 15.14). Эта частота в данном эксперименте составляла одну клетку на 480. Среднее значение по пяти опытам равнялось 1 на 590 или было приблизительно в два раза ниже числа предшественников пролиферирующих клеток. Таким образом, каждая из двух различных популяций Т-клеток с разной функциональной активностью характеризуется высокой частотой аллореактивных клеток.

15.9.2. Теоретические модели

Как объяснить высокую частоту аллореактивных Т-клеток? Предложены три основные модели (рис. 15.15). В модели Эрне [68] предполагалось, что молекулы МНС вызывают дифференцировку лимфоцитов, воздействуя на популяцию генетически детерминированных рецепторов, специфичных к данным МНС-молекулам. Модель предсказывала, что на лимфоциты, экспрессирующие рецепторы к «не-своим» молекулам МНС, процесс селекции в тимусе не оказывает влияния и они появляются на периферии как аллореактивные Т-клетки. Таким

образом, согласно этой модели, аллореактивные клетки представляют собой субпопуляцию, независимую от Т-клеток, распознающих собственные молекулы МНС в сочетании с чужеродными антигенами. В отличие от этого многие другие исследователи того времени придерживались мнения, что все Т-клетки должны обладать по меньшей мере одним рецептором к аллогенным молекулам МНС, поскольку частота аллореактивных клеток очень высока, а число аллогенных гаплотипов крайне велико. Таким образом, вторая модель предсказывала, что на каждом лимфоците происходит экспрессия двух рецепторов, один из которых специфичен к аллоантигену, а другой — к чужеродному антигену. Наконец, когда феномен МНС-рестрикции начали рассматривать с точки зрения модели Т-клеточного рецепторного комплекса, специфичного к чужеродному антигену

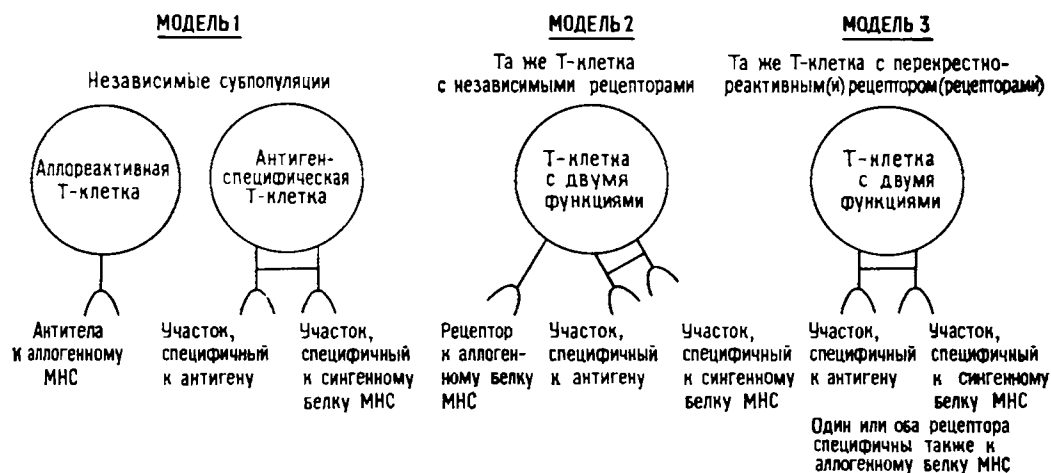


Рис. 15.15. Три модели аллореактивности.

и молекуле МНС, была предложена третья модель, основанная на понятии перекрестной реактивности. В этой модели постулировалось, что рецептор к аллоантигену — это тот же самый рецептор, что и рецептор к чужеродному антигену и собственной молекуле МНС. В случае рецептора с одним активным центром структура аллоантигена просто подобна комплексной антигенной детерминанте, в норме узнаваемой Т-клеточным рецептором. В других вариантах, рассматривающих Т-клеточные рецепторы с независимыми центрами связывания, предполагается, что эта перекрестная реактивность реализуется либо на уровне участка, специфичного к собственным молекулам МНС, либо на уровне участка, специфичного к антигену.

15.9.3. Репертуар Т-клеточного распознавания аллоантигенов и чужеродных антигенов перекрывается

15.9.3.1. Опыты с неразделенной популяцией Т-клеток

Опыты по проверке этих различных теорий были первоначально выполнены на неразделенной популяции лимфоцитов. В первом таком эксперименте, проведенном Хебер-Нац и Вильсоном [69], из популяции клеток грудного лимфатического протока одной инбредной линии крыс А положительной селекцией выделяли клетки, специфичные к антигенам другой линии крыс Q, несущей

аллогенный гаплотип *MHC*. Селекцию проводили с помощью стимуляции в смешанной культуре лимфоцитов облученными селезеночными клетками крыс линии Q. Чтобы сохранить и перевести в покоящееся состояние выжившие клетки, через 5 дней культивирования их вводили сингенным крысам, у которых были удалены Т-лимфоциты (так называемые «В-крысы»). Спустя две недели получали Т-клетки, дренируя грудной лимфатический проток в течение ночи, и оценивали аллореактивность этих клеток в реакции «трансплантат против хозяина» по увеличению региональных лимфатических узлов у крыс F_1 .

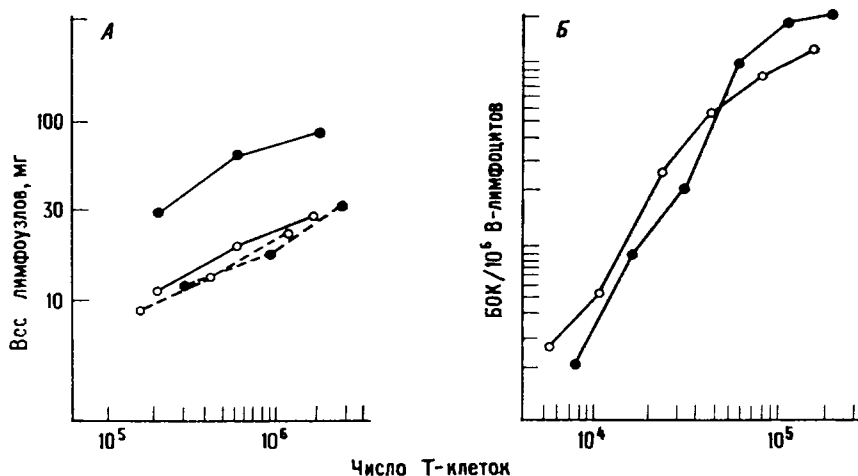


Рис. 15.16. Обогащение аллореактивных клеток не приводит к обогащению хелперных Т-клеток, специфичных к бараньим эритроцитам.

Лимфоциты грудного лимфатического протока крыс линии А стимулировали облученными клетками селезенки линии Q и проводили селекцию отвечающих лимфобластов, которые затем исследовали в двух тестах. А. Тест на способность этих клеток вызывать увеличение лимфатических узлов у крыс F_1 ($A \times Q$) (темные кружки, непрерывная линия) или F_1 ($A \times Z$) (темные кружки, прерывистая линия) (определение

аллореактивности в реакции трансплантат против хозяина). Б. Тест на способность этих клеток служить хелперами в первичном определении БОК in vitro (темные кружки). В качестве контролей оценивали увеличение лимфатических узлов крыс F_1 ($A \times Q$) (светлые кружки, непрерывная линия) или F_1 ($A \times Z$) (светлые кружки, прерывистая линия) в ответ на нормальные неселектированные лимфоциты грудного лимфатического протока крыс линии А, а также хелперную активность этих клеток (светлые кружки). (По [69].)

Кроме того, в этой популяции определяли активность хелперных клеток в первичном ответе БОК на БЭ. Как показано на рис. 15.16, А, клетки, отобранные в результате положительной селекции, оказались приблизительно в 10 раз эффективнее, чем неселектированные клетки линии А, если оценивать по сравнимому увеличению подколенных лимфатических узлов. Аллореактивный ответ этих двух популяций клеток на третий гаплотип *MHC* крыс линии Z оказался сравнимым. Хелперная активность селектированной и неселектированной популяций при ответе на чужеродный антиген (БЭ) представлена на рис. 15.16, Б. В противовес 10-кратным различиям в аллореактивности не было обнаружено сколь-нибудь значимой разницы в хелперной активности этих клеток. Из этого наблюдения авторы сделали вывод, что Т-клетки, специфичные к не-*MHC*-антигенам, таким, как БЭ, входят в состав Т-клеточной популяции, отвечающей на *MHC*-антигены. Другими словами, две рецепторные специфичности не экспрес-

сируются на различных субпопуляциях клеток, так как в противном случае селекция одной субпопуляции приводила бы к истощению другой. Однако, следуя той же логике, можно было ожидать, что аллореактивность против третьего гаплотипа МНС (например, линии Z) также должна быть снижена. Поскольку это оказалось не так (рис. 15.16, А), сделанные выводы не убедили большинство исследователей.

Дальнейший прогресс в этой области связан с исследованием цитотоксических Т-лимфоцитов. В процессе изучения различий в специфичности цитотоксических Т-лимфоцитов линии А или линии Q при ответе на ТНФ-модифицированные сингенные клетки Шмитт-Ферхюльст и Ширер [70] поставили контрольный эксперимент, в котором они сенсibilизировали клетки одной линии немодифицированными клетками другой линии (СКЛ), но затем определяли цитотоксическую активность против ТНФ-модифицированных мишеней, сингенных отвечающей линии А. Неожиданно было обнаружено, что цитотоксические Т-лимфоциты, генерированные против аллогенных молекул МНС, могли лизировать ТНФ-модифицированные сингенные мишени, хотя и не так эффективно, как немодифицированные аллогенные. Например, как видно из табл. 15.37,

Таблица 15.37. Аллореактивные цитотоксические Т-лимфоциты могут лизировать ТНФ-модифицированные сингенные мишени ¹⁾ (по [70])

Отвечающие клетки	Клетки-стимуляторы	Специфический выход ⁵¹ Cr из мишеней, %					
		Линия А		Линия Q		Линия Z	
		немод.	ТНФ-мод.	немод.	ТНФ-мод.	немод.	ТНФ-мод.
А	Q	0,3	23,1	41,4	38,9	8,5	19,8

¹⁾ Клетки селезенки линии А стимулировали *in vitro* немодифицированными аллогенными клетками селезенки линии Q и через 5 дней определяли цитотоксическую активность отвечающих клеток против модифицированных ТНФ и немодифицированных мишеней линии А, Q и Z.

клетки селезенки линии А, иммунные к спленоцитам линии Q, лизировали ТНФ-модифицированные, но не интактные клетки линии А. Эти цитотоксические клетки лизировали аллогенные мишени линии Q независимо от того, модифицированы они или нет, и интересно, что они слабо лизировали немодифицированные аллогенные мишени третьего вида (линии Z) (8,5%) и в значительно большей степени (19,8%), если мишени Z были модифицированы ТНФ. Из этих опытов следовало, что популяция Т-клеток, отвечающих на аллогенные молекулы гистосовместимости, содержит много различных клонов, одни из которых специфичны к ТНФ-модифицированным сингенным клеткам, другие — к аллогенным молекулам МНС третьего вида и третьи — к третьему виду молекул МНС, модифицированных ТНФ. К сожалению, эти наблюдения были объяснены неспецифическим лизисом любых ТНФ-модифицированных мишеней и данные авторы к ним в дальнейшем не возвращались.

Правильную интерпретацию этих результатов, а именно что Т-клетки, специфичные к аллогенным молекулам МНС, также специфичны к ТНФ-модифицированным сингенным молекулам МНС, впервые предложили Лемонье и др. [71]. Они повторили опыт Шмитт-Ферхюльст и Ширера [70] и затем при исследовании холодного торможения показали, что одни и те же клетки обладают и той

Таблица 15.38. Одна и та же цитотоксическая Т-клетка способна лизировать как аллогенные, так и ТНФ-модифицированные сингенные мишени ¹⁾ (по [71])

Холодные мишени	Торможение выхода ⁵¹ Сг, %
Линии А	23
ТНФ-модифицированные А	55
Линии Q	54
ТНФ-модифицированные	59
Линии Z	29
ТНФ-модифицированные	25

¹⁾ Клетки селезенки линии А стимулировали облученными клетками селезенки линии Q и определяли цитотоксическую активность отвечающих клеток против меченых ⁵¹Сг мишеней линии А. В таблице представлена способность немеченых холодных мишеней разных видов подавлять эту цитотоксическую активность (55% специфического лизиса). Курсивом выделено значимое торможение лизиса.

и другой специфичностью. Эти результаты представлены в табл. 15.38. Цитотоксические клетки селезенки линии А, специфичные к клеткам линии Q, были способны лизировать ТНФ-модифицированные мишени линии А. ТНФ-модифицированные немеченые (холодные) мишени линии А в 40-кратном избытке вызывали 55%-ное торможение выхода ⁵¹Сг из этих меченных мишеней, а немодифицированные клетки линии А — только 23%-ное торможение. ТНФ-модифицированные и немодифицированные холодные мишени линии Z, несущей третий, независимый гаплотип *MHC*, не вызывали значимого торможения (25—29%). Наиболее важное значение имеют данные о торможении лизиса меченных ⁵¹Сг ТНФ-модифицированных мишеней линии А немечеными клетками линии Q, которые несут аллогенные молекулы и которыми были исходно активированы цитотоксические Т-лимфоциты. Этот результат показывает, что цитотоксические Т-клетки, специфичные к модифицированным ТНФ собственным антигенам линии А, специфичны также к аллогенным молекулам *MHC* линии Q. Таким образом, клетки, специфичные к ТНФ-модифицированным мишеням линии А, не являются неспецифически вовлеченными в аллогенный ответ. Они определяют часть этого ответа и, следовательно, несут рецепторы, специфичные к детерминантам аллогенных молекул *MHC* и ТНФ-модифицированным собственным антигенным детерминантам. Из этого опыта нельзя заключить, распознаёт ли обе детерминанты один и тот же рецептор, поскольку в случае двух независимых рецепторов на клеточной поверхности связывание целой клетки (аллогенная холодная мишень) с одним рецептором будет стерически отменять взаимодействие второго рецептора с мечеными ⁵¹Сг ТНФ-модифицированными мишенями линии А.

Выявление субпопуляции аллореактивных Т-клеток, которые также специфичны к антигену в ассоциации с собственными *MHC*-молекулами, заставило отдельных исследователей взглянуть на явление перекрестной реактивности с другой стороны.

Первые успешные эксперименты с цитотоксическими Т-клетками, специфичными к минорным антигенам гистосовместимости, были проведены Бивеном [72]. Мышей F₁ (A.Y × A.X) (см. сноску на стр. 149) иммунизировали и стимулировали *in vitro* клетками селезенки мышей B.Y. Полученная популяция цитотоксических Т-лимфоцитов вызывала сильный лизис мишеней B.Y, но

совсем не лизировала сингенные мишени гибридов F_1 ($A.Y \times A.X$). Интересно, что при высоких отношениях эффекторных клеток к мишеням, например 90:1, отмечался небольшой уровень лизиса аллогенных мишеней $A.Z$ (рис. 15.17, А). Бивен справедливо предположил, что эта 1%-ная перекрестная литическая активность отражает существование небольшого числа аллореактивных клонов. Для исследования специфичности этих клонов он подверг положительной селекции их *in vitro* с помощью повторных стимуляций клетками селезенки линии $A.Z$. Через два цикла стимуляции исследовалась специфичность цитотоксических клеток (рис. 15.17, Б). Такие клетки вызывали уже сравнимый лизис мишеней $A.Z$ и $B.Y$, но по-прежнему не лизировали сингенные мишени животных F_1 ($A.Y \times A.X$). Опыты по холодному торможению показали, что лизис

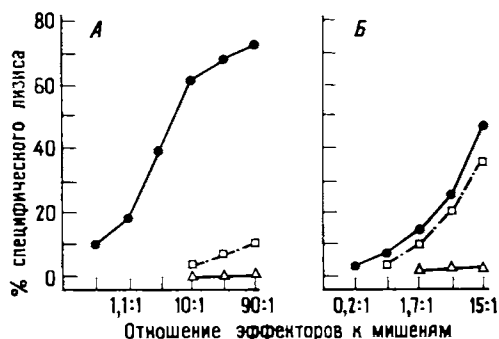


Рис. 15.17. Цитотоксические Т-лимфоциты, способные распознавать аллоантиген, и минорный антиген гистосовместимости в ассоциации с собственными молекулами МНС класса I.

Клетки селезенки мышей F_1 ($A.Y \times A.X$) были иммунизированы *in vivo* и повторно стимулированы *in vitro* клетками селезенки линии $B.Y$. Цитотоксическую активность

против мишеней $B.Y$ (кружки), аллогенных мишеней $A.Z$ (квадраты) или сингенных мишеней F_1 ($A.Y \times A.X$) (треугольники) определяли при различных соотношениях эффекторных Т-клеток и мишеней сразу после первой стимуляции *in vitro* (А) или после двух последующих стимуляций *in vitro* облученными клетками селезенки $A.Z$ (Б). (По [72].)

тех или других меченых ^{51}Cr мишеней можно ингибировать холодными мишенями как линии $A.Z$, так и линии $B.Y$. Из этого Бивен сделал вывод, что аллореактивные клетки, которые обнаруживаются в популяции цитотоксических клеток, специфичных к минорным антигенам гистосовместимости, не активированы неспецифически, а представляют собой клетки с двойной специфичностью к аллогенным молекулам МНС и минорным антигенам гистосовместимости в ассоциации с собственными молекулами МНС. Сходные выводы были впоследствии сделаны при исследовании цитотоксических клеток, специфичных к вирусу Сендай.

15.9.3.2. Опыты с Т-клеточными клонами

В последнее время существование Т-клеток с двойной специфичностью к аллоантигену и другим чужеродным антигенам в ассоциации с собственными молекулами МНС было четко продемонстрировано с помощью техники клонирования Т-лимфоцитов (см. гл. 30). Используя метод получения продолженной Т-клеточной линии с последующим клонированием предельными разведениями, фон Бёмер и др. [73] выделили цитотоксический Т-клеточный клон мышей C57BL/6, специфичный к антигену самцов Н-У, в ассоциации с собственной мо-

лекулой MHC, D^b . Как видно из рис. 15.18, этот клон лизирует клетки самцов, но не самок линии C57BL/6 (K^bD^b). Он также лизирует клетки самцов, но не самок линий B10.A (2R) (K^kD^b) и B10.A (4R) (K^kD^b). Однако при определении активности на мишенях линии B10.A (5R) (K^kD^d) клон давал сравнимый уровень лизиса клеток и самцов, и самок. Эта последняя специфичность, как было показано при дальнейшем генетическом картировании с использованием рекомбинантных линий мышей, направлена против продукта D^d и не зависит от присутствия антигена H-Y. Субклонирование показало, что все потомство исходного клона сохраняет ту же двойную специфичность к аллоантигену D^d и антигену H-Y в ассоциации с D^b . Этот вывод подтверждено также исследование холодного торможения. Лизис меченных ^{51}Cr клеток самцов C57BL/6-

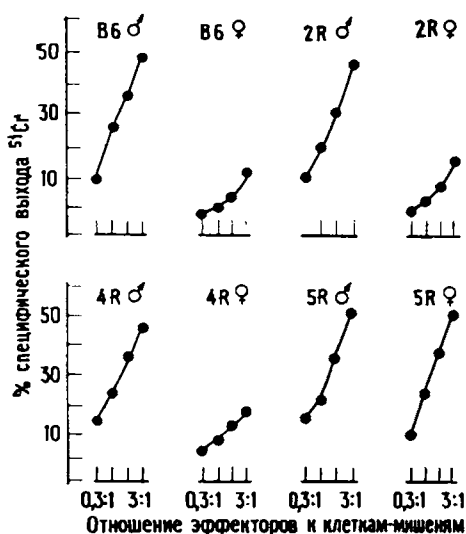


Рис. 15.18. Цитотоксический Т-клеточный клон со специфичностью к аллоантигену и минорному антигену гистосовместимости H-Y в ассоциации с молекулой MHC класса I. Мышей-самок C57BL/6 (B6) иммунизировали клетками селезенки самцов B6 и с помощью повторных стимуляций *in vitro* клетками самцов B6 получили цитотоксическую Т-клеточную линию. Клоны получены из этой линии методом предельных разведений; их специфичность определяли в цитотоксическом тесте на клетках-мишенях самцов и самок линий C57BL/6 (B6: K^bD^b), B10.A (2R) (K^kD^b), B10.A (4R) (K^kD^b) или B10.A (5R) (K^kD^d). (По [73].)

несущих D^b , блокировался одинаково хорошо сингенными клетками самцов C57BL/6 ($H-Y + D^b$) и аллогенными клетками самок DBA/2 (D^d).

Хотя экспериментальные данные об этом Т-клеточном клоне были достаточно убедительными, авторы по двум причинам не решились утверждать, что это типичные Т-клетки. Во-первых, неудачными оказались попытки с помощью повторных стимуляций *in vitro* аллогенными клетками DBA/2 ($H-2^d$) (сходный эксперимент описан на рис. 15.17) селективировать аллореактивные, D^d -специфические клетки Т-клеточных линий, иммунизированных *in vivo* и стимулированных *in vitro* клетками самцов C57BL/6. В связи с этим можно предположить, что такой клон является аномальным соматическим вариантом, возникшим в культуре. Во-вторых, можно регистрировать только специфичность литического действия цитотоксического клона, но не специфичность индукции ответа, поскольку выживание цитотоксических клонов полностью зависит от фактора роста Т-клеток; отсутствие этого фактора приводит к гибели клеток в течение 24—48 ч. Это оставляет открытой возможность, что перекрестная реактивность связана с вырожденностью рецептора клона, которая выявляется только при связывании с клеткой-мишенью. Такое связывание достаточно для лизиса мишени, тогда как истинная аллогенная перекрестная реактивность заключается в вырожденности специфичности рецептора на этапе клеточной активации.

Вопрос прояснился, когда Средни и Шварц [74] обнаружили антиген-специфический пролиферирующий Т-клеточный клон, который был специфичен также к аллоантигенам (табл. 15.39). Этот клон линии мышей В10.А одинаково хорошо отвечал на ДНФ-ОА в ассоциации с собственными молекулами МНС класса II, кодируемыми в субобласти $I-A^a$, и на аллогенные молекулы МНС класса II субобласти $I-A^s$ в отсутствие антигена (например, клетки селезенки В10.С; табл. 15.39). Все остальные исследованные популяции аллогенных кле-

Таблица 15.39. Аллореактивность антиген-специфического пролиферирующего Т-клеточного клона ¹⁾ (по [74])

Облученные клетки-стимуляторы	Гаплотип МНС	Антиген ДНФ-ОА	Пролиферативный ответ субклона 5.6 (имп./мин.)
В10.А	<i>a</i>	—	200
В10.А	<i>a</i>	+	39 200
В10	<i>b</i>	—	200
В10.Д2	<i>d</i>	—	400
В10.М	<i>f</i>	—	50
В10.Р	<i>p</i>	—	200
В10.Q	<i>q</i>	—	100
В10.RIII	<i>r</i>	—	50
В10.С	<i>s</i>	—	36 300
В10.РL	<i>u</i>	—	100

¹⁾ Мышей В10.А иммунизировали антигеном ДНФ-ОА и иммунные Т-клетки стимулировали *in vitro* антигеном в присутствии сингенных клеток селезенки, а затем клонировали в мягком агаре. Т-клеточные колонии отделяли, выращивали *in vitro* и дважды реклонировали. Специфичность полученных клонов определяли в системе Т-клеточной пролиферации. Клетки селезенки мышей, несущих различные гаплотипы МНС, служили клетками-стимуляторами в присутствии и в отсутствие антигена.

ток вообще не вызывали стимуляции. Данный клон был получен методом клонирования в мягком агаре через 3 дня после вторичной стимуляции *in vitro* ДНФ-ОА иммунных Т-клеток лимфатических узлов мышей В10.А. Этот метод клонирования исключает продолженную стимуляцию длительно культивируемых клеточных линий *in vitro* и тем самым снижает вероятность селекции необычных соматических вариантов. Клетки исходной колонии несколько раз реклонировали в мягком агаре с высокой эффективностью, чтобы убедиться в том, что двойная специфичность является свойством одной и той же клетки. Наконец, этот клон можно было стимулировать аллогенными клетками селезенки в отсутствие фактора роста Т-клеток. Действительно, клон удавалось поддерживать в культуре, используя клетки селезенки В10.С, вместо ДНФ-ОА и клеток селезенки В10.А. Таким образом, в отличие от цитотоксического клона и аллоантиген, и чужеродный антиген в ассоциации с собственными молекулами МНС могли вызывать пролиферацию этого антиген-реактивного Т-клеточного клона.

Из этих данных очевидно, что существуют антиген-специфические Т-клетки, которые характеризуются аллореактивностью. Следующий вопрос состоял в том, насколько часто подобные клетки встречаются во всей популяции Т-лимфоцитов. Первыми к этому вопросу обратились Шварц и Средни [75], которые иммунизировали ДНФ-ОА мышей конгенных по МНС линий В10.А, В10 и В10.С и с помощью клонирования в мягком агаре выделили от 20 до 40 антиген-

специфических колоний каждой линии. Затем определялась аллореактивность выросших колоний Т-лимфоцитов против клеток селезенки 8 различных гаплотипов *MHC*. Как показано в табл. 15.40, была обнаружена высокая частота колоний Т-клеток, характеризующихся и антигенной специфичностью, и аллореактивностью. В совокупности эта частота составляла 28%. В дальнейшем сходные данные получили Джейнуэй и Конрад (Janeway, Conrad), обнаружившие, что 6 из 29 (20%) ОА-специфических Т-клеточных колоний мышей

Таблица 15.40. Высокая частота антиген-специфических Т-клеточных колоний с сопутствующей аллореактивностью ¹⁾ (по [75])

Аллогенные стимуляторы	Число аллореактивных колоний мышей		
	B10.A	B10	B10.S
B10.A	—	1	0
B10	0	—	0
B10.D2	2	1	0
B10.M	1	1	6
B10.P	0	1	3
B10.Q	0	0	2
B10.RIII	1	0	1
B10.S	4	0	—
B10.PL	0	0	2
Общее количество	8/38	4/21	14/32
Частота, %	21	19	44

¹⁾ Т-клеточные колонии, специфичные к антигену ДНФ-ОА, были получены от мышей B10.A, B10 или B10.S, их аллореактивность определяли, как описано в табл. 15.39.

BALB/c обладают также и аллореактивностью. Если представить эти данные как функцию от числа исследованных независимых гаплотипов *MHC* (процент антиген-специфических колоний с аллореактивностью, деленный на число исследованных гаплотипов), то полученные значения частоты в отдельном эксперименте колебались от 2,5 до 5%. Это хорошо коррелирует с частотой аллореактивных пролиферирующих клеток на любой аллогенный гаплотип во всей популяции Т-лимфоцитов и указывает на то, что отобранные колонии представляют всю популяцию. Более того, если учитывать, что только 8 гаплотипов *MHC* использовалось для исследования аллореактивности, а в пределах вида установлено существование приблизительно 50 независимых гаплотипов *MHC* для молекул класса II, то можно сделать вывод, что даже те Т-клеточные колонии, у которых отсутствует аллореактивность, проявляют ее при исследовании всех независимых гаплотипов. Таким образом, эти данные свидетельствуют, что субпопуляция аллореактивных Т-клеток в большой степени перекрывается с Т-клеточной популяцией, специфичной к чужеродным антигенам в ассоциации с собственными молекулами *MHC*. Описанные наблюдения прямо противоположны исходному предсказанию модели Эрне [68], что эти две субпопуляции не перекрываются (рис. 15.15).

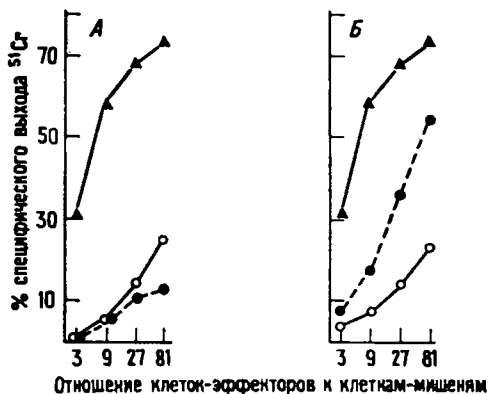
15.9.3.3. Эксперименты с радиационными костномозговыми химерами

Т-клетки радиационных костномозговых химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) распознают чужеродные (не-МНС) антигены преимущественно в ассоциации с молекулами МНС клеток P_1 по сравнению с молекулами МНС клеток P_2 . Кроме того, Т-клеточные популяции таких химер полностью толерантны к клеткам P_1 и P_2 (не проявляют к ним аллореактивности). Хюниг и Бивен [76] исследовали аллореактивность Т-лимфоцитов таких химер против молекул МНС третьей линии Z (рис. 15.19). В частности, они исследовали перекрестную цитотоксичность аллореактивных Т-лимфоцитов на ТНФ-модифицированных клетках P_1

Рис. 15.19. Собственные молекулы МНС, представленные в ходе развития, влияют на специфичность аллореактивных цитотоксических Т-клеток.

Клетки селезенки химер стимулировали *in vitro* облученными клетками селезенки аллогенной линии Z. Цитотоксическую активность отвечающих клеток определяли против меченных ^{51}Cr клеток-мишеней линии Z (треугольники), ТНФ-модифицированных мишеней линии A (светлые кружки) или ТНФ-модифицированных мишеней линии Q (темные кружки).

А. Клетки селезенки химер F_1 ($A \times Q$) (к.м.) $\rightarrow A$ (обл.), Б. Клетки селезенки химер F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow Q$ (обл.).



(линии A) и P_2 (линии Q). Подобно наблюдениям Шмитт-Ферхюльст и Ширера [70] (табл. 15.37) и Лемонье [71] (табл. 15.38), Хюниг и Бивен обнаружили небольшой, но значимый уровень перекрестного лизиса ТНФ-модифицированных клеток селезенки линии A и линии Q (рис. 15.19). Однако, если использовали Т-клетки химер F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow A$ (обл.), уровень лизиса ТНФ-модифицированных клеток линии A был выше, чем в случае ТНФ-модифицированных клеток линии Q (рис. 15.19, А). При использовании Т-клеток химер F_1 ($A \times Q$) (к. м.) $\rightarrow Q$ (обл.) лизис ТНФ-модифицированных клеток линии Q был выше, чем лизис ТНФ-модифицированных клеток линии A (рис. 15.19, Б). Таким образом, аллореактивные Т-клетки подобных химер характеризуются преимущественной перекрестной цитотоксичностью против ТНФ-модифицированных клеток, несущих гаплотип МНС облученного реципиента. Эти результаты демонстрируют, что радиорезистентные клетки микроокружения реципиента оказывают влияние по меньшей мере на часть аллореактивной популяции так же, как и на репертуар Т-клеток, специфичных к другим чужеродным антигенам. Это наблюдение не согласуется с исходной гипотезой Эрне [68] и предполагает сходные влияния микроокружения, в котором происходит дифференцировка, на все Т-клетки.

15.9.4. Современное состояние вопроса

В настоящее время большинство исследователей признают, что феномен аллореактивности тесно связан с феноменом МНС-рестрикции и рецепторы, которые их опосредуют, экспрессируются одной и той же Т-клеткой. Однако физическая связь между этими рецепторами до сих пор является предметом

жарких споров. Каждая точка зрения, в общем, коррелирует с определенными представлениями о структуре антиген-специфического рецептора, но большинство исследователей связывают аллореактивность с одним или с другим участком рецепторной молекулы. В этом смысле аллореактивность можно рассматривать как еще один пример вырожденности специфичности Т-клеточного распознавания. Действительно, совсем недавно, например, описан Т-клеточный клон [43], пролиферацию которого стимулируют а) антиген в ассоциации с собственной молекулой Ia, б) аллогенная молекула Ia (слабая стимуляция) и в) антиген в ассоциации с аллогенной молекулой Ia (сильная стимуляция). Ни одна из остальных исследованных аллогенных молекул Ia не стимулировала ответа как в присутствии, так и в отсутствие антигена. Эта корреляция между аллореактивностью и избирательным исключением из правила МНС-рестрикции ясно указывает, что оба феномена являются результатом перекрестной специфичности одного и того же Т-клеточного рецептора.

15.10. Реакция смешанной сингенной культуры лейкоцитов

В 1973 г. Хау (Howe), а также фон Бёмер и Адамс (Von Boehmer, Adams) обнаружили, что тимоциты новорожденных мышей будут пролиферировать при стимуляции облученными клетками селезенки сингенных взрослых мышей, лишенными Т-лимфоцитов. Последующее исследование Тerasaki и Векслера (Terasaki, Weksler), проведенное на клетках человека, показало, что очищенная популяция периферических Т-лимфоцитов также пролиферирует при стимуляции аутологичными «не-Т-лимфоцитами» (В-лимфоцитами и моноцитами). Эта реакция получила название сингенной или аутологичной смешанной культуры лейкоцитов (ССКЛ). Первоначально многие иммунологи восприняли ССКЛ как некий артефакт *in vitro*. Например, можно было предположить, что Т-лимфоциты при очистке от вспомогательных клеток, таких, как макрофаги, не обеспечиваются необходимой для выживания питательной средой и гибнут в культуре. В отличие от этого в присутствии таких клеток, обнаруживаемых в популяции стимуляторов, Т-лимфоциты выживают и развивают индуцированные иммунные реакции, которые неправильно интерпретировались как ССКЛ.

Однако дальнейшие исследования в ряде лабораторий показали, что ССКЛ представляют собой специфический иммунный ответ. Создание системы определения вторичного ответа позволило выявить в этой реакции специфичность и иммунологическую память. На рис. 15.20 показан эксперимент Векслера и Козака [77], проведенный с ССКЛ человека, которая, согласно кинетике вторичного ответа, достигала пика на 3-й день в отличие от первичного ответа с пиком на 7-й день. На рис. 15.21 представлено исследование Глимчера и др. [78] мышинной ССКЛ, в котором продемонстрирован хороший вторичный ответ на популяцию сингенных клеток-стимуляторов BALB/c, но только слабый ответ на популяцию аллогенных клеток-стимуляторов СЗН. Эти результаты показывают, что реакция ССКЛ характеризуется памятью (более быстрый вторичный ответ) и специфичностью (ответ на сингенные, но не аллогенные клетки), т. е. признаками иммунного ответа.

Последующие исследования показали, что этот ответ Т-клеток также рестриктирован по МНС. Это было показано двумя путями. Во-первых, Ямашита и Шивах [79] в опыте по положительной селекции обнаружили (см. табл. 15.9), что у морских свинок F_1 существуют две популяции Т-лимфоцитов, отвечающих в ССКЛ, каждая из которых специфична к продуктам одного из двух родитель-

Таблица 15.41. Выявление независимых субпопуляций Т-клеток, вызывающих реакцию ССКЛ у морских свинок гибридов F_1 ¹⁾ (по [79])

Клетки, стимулировавшие первичную культуру Т-клеток F_1	Пролиферативный ответ (имп./мин) во вторичной культуре на стимуляторы	
	Линия 2	Линия 13
Макрофаги линии 2	100 500	7900
Макрофаги линии 13	12 700	32 300

¹⁾ Т-клетки лимфатических узлов морских свинок $F_1(2 \times 13)$ культивировали в течение 14 дней с перитонеальными макрофагами линии 2 или линии 13. Клетки, полученные из таких культур, рестиमुлировали выделенными макрофагами линии 2 или 13 и спустя 4 дня пролиферативный ответ оценивали по включению ^3H -тимидина (имп./мин.).

ских гаплотипов МНС. Как показано в табл. 15.41, при первоначальной стимуляции Т-клеток гибрида $F_1(2 \times 13)$ макрофагами родительской линии 2 рестимуляция во вторичной культуре дает сильный ответ, тогда как рестимуляция

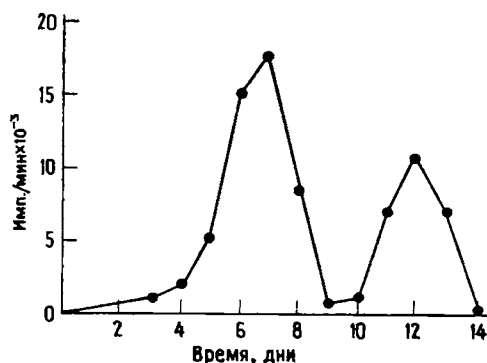


Рис. 15.20. Реакция ССКЛ характеризуется иммунологической памятью.

Очищенные Т-лимфоциты человека были стимулированы облученными аутологичными «не-Т»-клетками; затем определяли пролиферативный ответ в зависимости от времени культивирования. Через 9 дней, когда первичный ответ снижался, клетки из оставшихся культур отмывали и повторно стимулировали облученными аутологичными «не-Т»-клетками. Вторичный ответ достигал пика через 3 дня в отличие от первичного ответа, который достигал максимума за 6–7 дней. (По [77].)

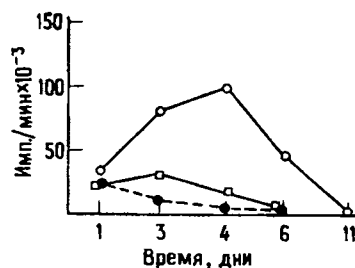


Рис. 15.21. Реакция ССКЛ характеризуется специфичностью.

Т-клетки селезенки безмикробных мышей BALB/c стимулировали *in vitro* обогащенными в градиенте концентрации БСА облученными сингенными клетками селезенки мышей, содержащихся в обычных условиях. В эти культуры было добавлено 2% человеческой сыворотки. Через 14–17 дней выжившие клетки были повторно стимулированы в культурах, содержащих нормальную мышиную сыворотку и нефракционированные клетки селезенки безмикробных сингенных мышей (светлые кружки), нефракционированные клетки селезенки обычных аллогенных мышей СЗН (квадраты) или, в качестве контроля, не содержащих клеток селезенки (темные кружки). (По [78].)

макрофагами родительской линии 13 не дает ответа. Во-вторых, Глимчер и др. [78] показали с помощью радиационных костномозговых химер, что МНС-специфичность Т-лимфоцитов в ССКЛ определяется микроокружением облученного реципиента, в котором клетки созревают. Таким образом, как видно

Таблица 15.42. Т-лимфоциты химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) в реакции ССКЛ преимущественно отвечают на клетки-стимуляторы P_1 ¹⁾ (по [78])

Источник Т-клеток	Пролиферативный ответ (имп./мин) на	
	B10	B10.A
F_1 (B10 $\times$ B10.A) (к. м.) $\rightarrow$ B10 (обл.)	47 300	2800
F_1 (B10 $\times$ B10.A) (к. м.) $\rightarrow$ B10.A (обл.)	4100	40 900
Нормальные F_1 (B10 $\times$ B10.A)	30 000	27 100

1) Мышей B10 или B10.A облучали в летальной дозе (950P) и затем им вводили костный мозг мышей F_1 (B10 $\times$ B10.A), из которого были предварительно удалены Т-клетки. Спустя 3–6 мес Т-клетки этих химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) стимулировали облученными селезеночными клетками B10 или B10.A низкой плотности, фракционированными в градиенте концентрации бычьего сывороточного альбумина. Включение тимидина определяли через 6 дней (имп./мин).

из табл. 15.42, Т-клетки химер F_1 (B10 $\times$ B10.A) (к. м.) $\rightarrow$ B10 (обл.) дают сильную реакцию ССКЛ при стимуляции клетками селезенки B10 и лишь слабый ответ на клетки селезенки B10.A. Т-клетки химер F_1 (B10 $\times$ B10.A) (к. м.) $\rightarrow$ B10.A (обл.) дали противоположные результаты, сильную реакцию ССКЛ при стимуляции клетками селезенки B10.A и слабый ответ ССКЛ на клетки селезенки B10. В контроле Т-клетки нормальных мышей F_1 (B10 $\times$ B10.A) давали одинаковый ответ на оба вида стимуляторов. Выраженное предпочтение в ответе химерных клеток, вызывающих ССКЛ, на стимуляторы реципиента указывает, что эти Т-клетки способны распознавать только определенные молекулы МНС и что такая способность к распознаванию является приобретенным свойством. Исследования блокирующего действия антител в опытах на морских свинках и мышах свидетельствуют о том, что критическими, распознаваемыми в ССКЛ рестриктивными элементами являются молекулы МНС класса II.

Таким образом, во всех исследованных аспектах Т-лимфоциты, отвечающие в ССКЛ, кажутся подобными Т-клеткам, участвующим в любом индуцированном антигеном пролиферативном ответе. Почему тогда этими клетками не могут быть просто Т-лимфоциты, примированные к антигенам внутренней среды организма? Это утверждение труднее всего опровергнуть. Чтобы свести к минимуму предшествующий контакт с чужеродными антигенами, в качестве источника отвечающих Т-лимфоцитов использовались безмикробные животные (рис. 15.21). Однако этот подход не исключал ответа на эндогенные вирусные антигены. Наиболее убедительные данные о том, что реакция ССКЛ представляет собой первичный ответ на молекулы МНС класса II, были получены в опытах Глимчера и др. [78], проведенных на аллогенных химерах. Т-лимфоциты химер P_1 (к. м.) $\rightarrow P_2$ (обл.) не отвечают на ряд растворимых белковых антигенов при иммунизации мышей в полном адьюванте Фрейнда. Это связано в основном с тем, что Т-клетки «обучены» распознавать молекулы МНС клеток P_2 , как свои собственные, а периферические АПК несут молекулы МНС клеток P_1 . Тем не менее неиммунные Т-клетки этих химер дают нормальный ответ при стимуляции в ССКЛ МНС-молекулами P_2 и слабый, но вполне значимый, ответ в ССКЛ против МНС-молекул P_1 (табл. 15.43). Сходные результаты, полученные на химерах P_1 (тим.) $\rightarrow P_2$ (nu) (табл. 15.43), показывают, что тимус является органом, диктующим специфичность рестрикции Т-лимфоцитов. На фоне слабого ответа или отсутствия ответа на чужеродные антигены нормальная

Таблица 15.43. Аллогенные химеры развивают реакцию ССКЛ преимущественно на тип молекул МНС, экспрессированных в тимусе ¹⁾ (по [80])

Опыт	Источник Т-клеток	Пролиферативный ответ (имп./мин) на		
		B10 или B6	B10.A	BALB
1	B10.A (к. м.) → B10 (обл.)	69 800	11 400	—
2	B6 (тим.) → BALB (nu)	36 200	—	3200
3	BALB (тим.) → B10 (nu)	1700	—	16 600

¹⁾ В опыте 1 летально облученным (950Р) мышам B10 вводили лишенный Т-клеток костный мозг мышей B10.A. В опытах 2 и 3 бестимусным мышам BALB и B10 пересаживали доли тимуса линии B6 или BALB соответственно. Спустя 3–6 мес. определяли реакцию Т-клеток этих химер в ССКЛ против клеток-стимуляторов, несущих гаплотип МНС донора или реципиента.

реакция ССКЛ на молекулы МНС клеток P_2 представляет, вероятно, первичный иммунный ответ. Слабый ответ на молекулы МНС клеток P_1 можно объяснить вырожденностью Т-клеточного репертуара.

В чем тогда заключается значение реакции ССКЛ? Общепринятого ответа на этот вопрос нет, существуют только предположения. Возможно, эта реакция представляет аутоиммунный ответ, т. е. ответ на собственные антигены в ассоциации с собственными молекулами МНС класса II, который в норме подавлен *in vivo* (гл. 20). Эта реакция может представлять ответ незрелых Т-лимфоцитов только на молекулы Ia, что приводит к дифференцировке клеток в антиген-специфические Т-лимфоциты. Антиген-специфические Т-лимфоциты затем отвечают только на сочетание антигена и молекул МНС класса II. Эта реакция может быть связана также с субпопуляцией антиген-специфических клеток с достаточно высокой аффинностью к собственным молекулам Ia, чтобы вызвать стимуляцию в отсутствие антигена в специфических условиях *in vitro*. Недавно

Таблица 15.44. Т-клеточные гибридомы, полученные в результате слияния иммунных Т-клеточных blastов к инсулину свиньи и тимомы BW5147 ¹⁾ (по [81])

Фенотип	Клон №	Определение образования IL-2 (имп./мин.) в ответ на	
		клетки селезенки	клетки селезенки + инсулин
I	A16	700	15 700
	B14	800	23 900
II	A5	4100	16 500
	A12	12 600	27 400
III	A2	17 200	19 200
	B17	34 700	28 400

¹⁾ Т-клеточные гибридомы были получены в результате слияния тимомы BW5147 со стимулированными антигеном Т-клеточными blastами, специфичными к инсулину свиньи. Жизнеспособные гибридомы селектировали в среде с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (подробнее см. в гл. 30). Специфичность гибридом оценивали с помощью 48-часовой стимуляции в присутствии или отсутствия антигена и последующего определения секретированного в культурную среду интерлейкина 2 (IL-2). Последнее оценивали по способности супернатантов культур поддерживать рост Т-клеточной линии HT-2, для пролиферации которой необходим IL-2.

Данные в имп./мин. представляют включение ³H-тимидина в клетки линии HT-2.

эта последняя точка зрения получила подтверждение в опытах по клонированию Т-лимфоцитов. Глимчер и Шивах [81] получили серию Т-клеточных гибридом при слиянии клеток тимомы BW5147 с Т-клеточными бластами животных F_1 , специфичными к инсулину свиньи. Как видно из табл. 15.44, были получены Т-клетки трех различных фенотипов. Одна группа Т-гибридом отвечала на инсулин свиньи в ассоциации с клетками гибридов F_1 селезенки, но не отвечала на одни F_1 -клетки селезенки. Вторая группа слабо отвечала на F_1 -клетки селезенки, но при добавлении инсулина свиньи ответ усиливался. Третья группа давала максимальный ответ на F_1 -клетки селезенки независимо от добавления инсулина. По-видимому, эта последняя группа представлена клонами, подобными клонам, отвечающим в реакции ССКЛ. Выявление спектра Т-клеточных клонов, варьирующего от абсолютной антигенной специфичности до полной независимости от антигена, указывает, что Т-клетки, отвечающие в реакции ССКЛ, являются, вероятно, субпопуляцией нормального Т-клеточного репертуара, которая активируется непосредственно молекулами МНС класса II. Значение этого феномена для модели Т-клеточного распознавания обсуждается в гл. 11.

15.11. Почему распознаются молекулы МНС

Когда было установлено, что Т-лимфоциты распознают не только антиген, но и молекулы МНС, возник очевидный вопрос: почему они узнают молекулы МНС? Исчерпывающего ответа на этот вопрос пока еще нет. Одно из возможных объяснений было предложено Лэнгманом [82]. Оно заключается в том, что эти молекулы участвуют в передаче и(или) приеме сигнала клеткой. Исходная концепция Лэнгмана [82], рассматривающая распознавание цитотоксических Т-лимфоцитов, постулирует, что молекулы МНС класса I связаны с другой молекулой, называемой акцептором, которая принимает литический сигнал цитотоксической Т-клетки. Однако молекулы МНС класса I сами способны передавать такой сигнал, поскольку, как мы сейчас знаем, они представляют собой трансмембранные белки (см. гл. 14). Аналогично этому Кон и Эпштейн [83] предположили, что Т-клетки при МНС-рестриктированных взаимодействиях с В-лимфоцитами передают хелперный сигнал через молекулы МНС класса II. В модели двух активационных сигналов В-клетки принимают первый сигнал, когда антиген связывается с иммуноглобулиновым рецептором. Затем Т-клетки обеспечивают передачу второго сигнала через молекулы МНС класса II, когда Т-клетки сочетанно распознают антиген и молекулы МНС класса II на поверхности В-лимфоцита. Согласно такой модели, антиген служит мостиком для создания контакта эффекторной Т-клетки и В-лимфоцита соответствующей специфичности. Если антиген обладает уникальной структурой без повторяющихся детерминант (как, например, мономерный белок), то Т-клеточный рецептор вынужденно будет распознавать антигенные детерминанты, отличные от распознаваемых В-лимфоцитами.

В случае взаимодействий макрофагов и Т-клеток картина оказывается более сложной. Хотя установлено, что активированные Т-клетки индуцируют МНС-рестриктированное образование макрофагами активатора плазминогена, обычно иммунологи, — наоборот, изучают активацию покоящихся Т-лимфоцитов нагруженными антигеном макрофагами. При этом активационном событии информация в какой-то момент должна идти от макрофага к Т-лимфоциту. Простая модель, обсуждавшаяся в литературе, отводит молекулам МНС функцию переносчика сигнала от Т-клеток к их мишеням (рис. 15.22). Вначале происхо-

дит распознавание Т-клеточным рецептором антигена и молекул МНС класса II на поверхности макрофага. Это приводит к двум последующим событиям: 1) происходит передача макрофагам сигнала через молекулы МНС класса II, что в свою очередь приводит к образованию и(или) высвобождению такого активирующего Т-лимфоцита фактора, как интерлейкин 1; 2) происходит передача сигнала Т-клетке через рецепторную молекулу, что делает Т-клетку восприимчивой к действию интерлейкина 1 (т. е. приводит к образованию рецепторов к интерлейкину 1) или дополняет активирующее действие интерлейкина 1 на Т-клетку (в модели, постулирующей наличие двух сигналов). Согласно этой модели, все клетки, несущие молекулы МНС класса II, могут получать информацию от Т-лимфоцитов, но только субпопуляция, способная отвечать образованием интерлейкина 1, функционирует как АПК. Очевидно, можно представить

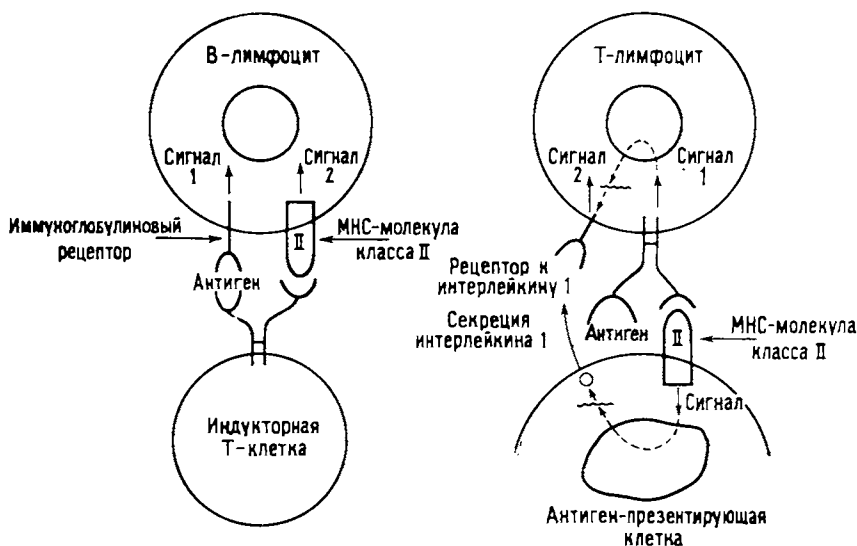


Рис. 15.22. Модели, объясняющие роль молекул МНС класса II в активации В- и Т-лимфоцитов.

и более сложные модели, в которых сигнал передается через молекулы МНС в обоих направлениях, однако пока еще мы не располагаем достаточным количеством экспериментальных данных для рассмотрения таких вариантов.

В первоначальной модели передачи сигнала каждый класс молекул МНС рассматривался как переносчик определенного сигнала. В этом случае В-лимфоцит, например, получает хелперный сигнал через свои молекулы МНС класса II, а литический сигнал от цитотоксической Т-клетки — через молекулы класса I. Эта двойственность структуры и функции молекул МНС всегда выявлялась при изучении антиген-специфических Т-лимфоцитов. Однако дальнейшие экспериментальные наблюдения показали, что можно генерировать цитотоксические Т-лимфоциты к аллогенным молекулам МНС класса II, а хелперные Т-клетки — против аллогенных молекул МНС класса I. Другими словами, любая эффекторная функция, хелперная или цитотоксическая, может осуществляться через любые МНС-молекулы (или же ассоциирована с двумя типами молекул-акцепторов сигнала). Таким образом, передача сигнала может быть вырожденной и, следовательно, не может служить единственным обстоятельством, обуславливающим рестрикцию Т-клеток по молекулам МНС.

Ключ к раскрытию этой загадки, вероятно, заключается в различии между антигеном-мишенью и рестриктурирующим элементом. Цитотоксические Т-лимфоциты способны распознавать ряд молекул МНС на аллогенных клетках. Так, например, цитотоксические Т-клетки мышей линии А могут распознавать молекулы Qa2^b на поверхности лимфоцитов мышей линии В. Однако пока еще никому не удалось показать, что цитотоксические Т-лимфоциты линии А когда-либо узнают чужеродные антигены, такие, как вирусы, в ассоциации с молекулой Qa2^a. Другими словами, молекулы Qa2 могут служить акцепторами цитотоксического сигнала, но не функциональными рестриктурирующими элементами. Единственные у мышей молекулы МНС класса I, рестриктурирующая функция которых установлена, кодируются в областях *H-2K*, *H-2D* и *H-2L*. Для молекул МНС класса II — это субобласти *I-A*, *I-E* и *I-J*. Как только мы рассматриваем молекулы МНС с точки зрения распознавания «своего» (как рестриктурирующие элементы), сразу выявляется очевидное различие между молекулами класса I и II. Цитотоксические Т-лимфоциты распознают антиген только в ассоциации с молекулами МНС класса I, а хелперные и пролиферирующие Т-лимфоциты — только в ассоциации с молекулами МНС класса II. Это различие наводит на мысль, что молекулы МНС играют роль молекул клеточных взаимодействий или опознавательных знаков для Т-лимфоцитов и что каждый класс молекул «обслуживает» определенную субпопуляцию клеток. В таком случае должен существовать некий механизм, с помощью которого Т-клетки с данной функцией приобретают способность распознавать определенный класс молекул МНС. Такой этап дифференцировки Кон и Лэнгман [84] назвали «установлением связи между рестрикцией и функцией». Ими же было постулировано, что это происходит в тимусе в отсутствие антигена. Эта модель объясняет биологические основы онтогенетического формирования МНС-рестрикции. Разные рестриктурирующие элементы должны распознаваться разными рецепторами Т-лимфоцитов с различной функцией. Такое условие проще всего выполняется в случае существования в тимусе индукторных клеток двух типов: одни экспрессируют молекулы МНС только класса I, а другие — только класса II. Любой незрелый Т-лимфоцит, способный связываться с молекулами класса I, получает дифференцировочный сигнал от одной индукторной клетки, что направляет его по пути дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов. Аналогично любой незрелый Т-лимфоцит, способный связываться с молекулами МНС класса II, получает дифференцировочный сигнал от другой индукторной клетки, который направляет клетку далее по пути дифференцировки Т-хелперов. В отличие от этого при описании МНС-рестрикции в строгой модели первичной иммунизации («примирования») необходимо постулировать генетическую зависимость специфичности рецептора и функции Т-клетки. Иными словами, экспрессия генов, кодирующих структуры, подобные V-области, со специфичностью к молекулам МНС класса I, должна быть связана с экспрессией продуктов генов, ответственных за формирование фенотипа цитотоксической Т-клетки.

Если молекулы МНС рассматривать в свете их возможной роли как молекул клеточных взаимодействий для различных субпопуляций Т-лимфоцитов, можно прийти к выводу, что биологическое значение феномена МНС-рестрикции невелико. Прежде всего Т-лимфоциты в норме распознают антиген только в окружении собственных молекул МНС. Когда в эксперименте исследуется способность Т-лимфоцитов распознавать антиген в окружении аллогенных молекул МНС, создается искусственная ситуация. Только отсутствие такого распознавания у Т-клеток говорит нам нечто важное о молекулах МНС. Они высоко полиморфны. Если задаться целью описать биологическую систему, в которой распознавание определенных молекул на клетке-мишени должно быть ассоци-

ированно с определенными субпопуляциями эффекторных клеток, то этого легко достичь с помощью набора рецептор-акцепторных (CI) молекул, которые неpolиморфны у представителей данного вида. Возможно ли, что этот полиморфизм также имеет критическое значение для Т-клеточного распознавания молекул МНС?

Вопрос о причине полиморфизма МНС-молекул был поднят иммунологами уже много лет назад. Оценки числа стабильных аллелей (частота 0,01 или больше) локусов *H-2K* и *D* у мышей достигают приблизительно 100. Очень мало других генетических локусов проявляют такой полиморфизм, да и те обычно обладают доминирующим аллелем, — например, для локуса *Xdh* дрозофилы частота общего аллеля составляет 0,3. Для локусов *H-2K* и *D*, по данным типирования диких мышей, показатели частоты для различных аллелей варьировали от 0,003 до 0,14 со средним значением 0,035. Однако в случае исследования локального распределения аллелей *H-2* в малой части мировой популяции наблюдаются большие отклонения от среднего значения: обнаруживается много минорных аллелей и наблюдаются доминирующие аллели. Эти локальные флуктуации в пределах популяции могут быть следствием дрейфа генов и закрепления доминирующего аллеля. Тот факт, что полиморфизм оказывается стабильным на фоне этих флуктуаций, указывает на действие сильного давления отбора, направленного на поддержание разнообразия молекул МНС.

Как можно соотнести МНС-рестрикцию и эту тенденцию генетического полиморфизма? Теория, формировавшаяся в течение последних 15 лет, объясняет это следующим образом. Т-клеточный иммунитет первоначально возник для борьбы с внутриклеточными инфекционными агентами, такими, как вирусы или некоторые бактерии, подобные листерии. Для уничтожения этих организмов необходимо найти клетки, в которых они обитают, и либо разрушить эти клетки (цитотоксические Т-лимфоциты), либо активировать их (путем высвобождения лимфокинов из хелперных Т-лимфоцитов), так чтобы они оказались способны разрушать паразитов внутри себя. Чтобы добиться этого, иммунная система должна опознать чужеродный антиген, экспрессированный на поверхности инфицированных клеток, и не должна быть заблокирована свободным антигеном, циркулирующим в крови. Это условие выполняется в результате формирования распознающей системы, в которой для активации Т-лимфоцитов и чужеродный антиген, и белок клеточной поверхности должны быть распознаны одновременно. Какой именно белок клеточной поверхности должен быть распознан, зависит от функции данной субпопуляции Т-лимфоцитов. В том случае, если эта система представлена неpolиморфными белками в качестве молекул клеточных взаимодействий, возникает следующая проблема. Для исключения неспецифической реакции на белки клеточных взаимодействий (CI) антиген-специфический компонент Т-клеточной распознающей структуры должен быть толерантным к белкам CI и не должен распознавать других белков клеточной поверхности в ассоциации с молекулами CI. Тогда любой инфекционный агент, способный имитировать структуру молекул CI или другие собственные антигены организма в ассоциации с ними, может остаться нераспознанным и убить хозяина. Единственное решение этой проблемы — при условии сохранения той же распознающей системы на поверхности клетки — заключается в многообразии молекул клеточных взаимодействий. Таким образом, только некоторые представители вида окажутся чувствительными к любому инфекционному агенту, который может имитировать определенную молекулу МНС и ассоциироваться с другими собственными антигенами организма. Эта схема, хотя и чисто умозрительная, дает читателю почву для размышлений о том, почему полиморфные молекулы МНС выполняют роль рестриктирующих элементов.

15.12. Эволюция МНС

Ранние оценки скорости мутирования локусов *H-2K* и *H-2D* мышей указывали на очень высокую частоту мутаций этих генов. Для гена *K^b*, например, она составляет приблизительно $\approx 10^{-4}$. Однако современный структурный анализ на уровне белков и нуклеиновых кислот показал, что многие из этих вариантов возникли не в результате точковой мутации, а, вероятно, вследствие реципрокной рекомбинации или конверсии генов в пределах семейства гомологичных генов, которые включают в себя последовательности, кодирующие молекулы МНС класса I (см. гл. 14). Можно ожидать, что этот механизм играет ключевую роль в формировании разнообразия молекул МНС в пределах вида и приводит к значительным межвидовым различиям. Действительно, в пределах вида аллельные варианты представляют сумму определенного числа генетических событий, которые определяют лишь 80% гомологии на уровне белковой последовательности. Удивительно, однако, что некоторые имеющиеся данные свидетельствуют о высокой эволюционной консервативности молекул МНС. Например, линия мышей B10.MOL1, конгенная линии B10, была получена Кляйном и Фигуероа [85] в результате переноса локуса *MHC* от мышей подвида *Mus musculus mollosinus* на базовый генотип (генетическую основу) мышей C57BL/10 с помощью ряда скрещиваний. Серологический анализ аллельных продуктов показал, что продукты области *K* и субобласти *I-A* идентичны продуктам аллеля *k* инбредной линии B10.BR подвида мышей *Mus musculus mollosinus*. Эти два подвида, по данным рестрикционного картирования их ДНК, дивергировали приблизительно от 1 до 2,5 млн. лет назад. Другим примером может служить перекрестная межвидовая серологическая реактивность антител к молекулам МНС класса II. Как сообщалось, мышиные антитела против Ia взаимодействуют с молекулами МНС класса II человека (DR). Такие проявления эволюционного консерватизма на фоне быстрого механизма генетической диверсификации указывают на то, что на МНС действует сильное давление отбора. Это в первую очередь влияние инфекционных организмов, которое обсуждалось в предыдущем разделе.

Другим интересным аспектом эволюции МНС, в принципе согласующимся с сильным давлением отбора, является неравновесное сцепление, обнаруженное в разных группах аллелей молекул класса I и II, которые составляют гаплотип *MHC*. Типирование диких мышей, проведенное Кляйном и Фигуероа [85], выявило большое число случаев частичного совпадения гаплотипа *MHC* дикой мыши и известных инбредных линий. Идентичные наборы аллелей представлены в основном в областях *K* и *I*, где гены тесно сцеплены. Действительно, можно предположить, что такое тесное сцепление является долгосрочным эволюционным механизмом сохранения комбинации аллелей различных локусов, взаимодействующих друг с другом. Однако данные, которыми мы располагаем, слишком фрагментарны, чтобы быть уверенным в том, существует ли действительно неравновесное сцепление или у популяции просто не было достаточно времени для достижения равновесия.

Данные такого рода указывают, что гаплотип *MHC*, как функциональная генетическая единица, обладает эволюционным преимуществом, по-видимому, в связи со значимостью *MHC* для выживания. Становится интересным проследить эволюционную историю *MHC* и определить, когда и по возможности как он возник. До сих пор биологи использовали два подхода для выявления молекул МНС — определение трансплантационных реакций (тканевой несовместимости) и определение реакции СКЛ. В последней реакции оцениваются в основном

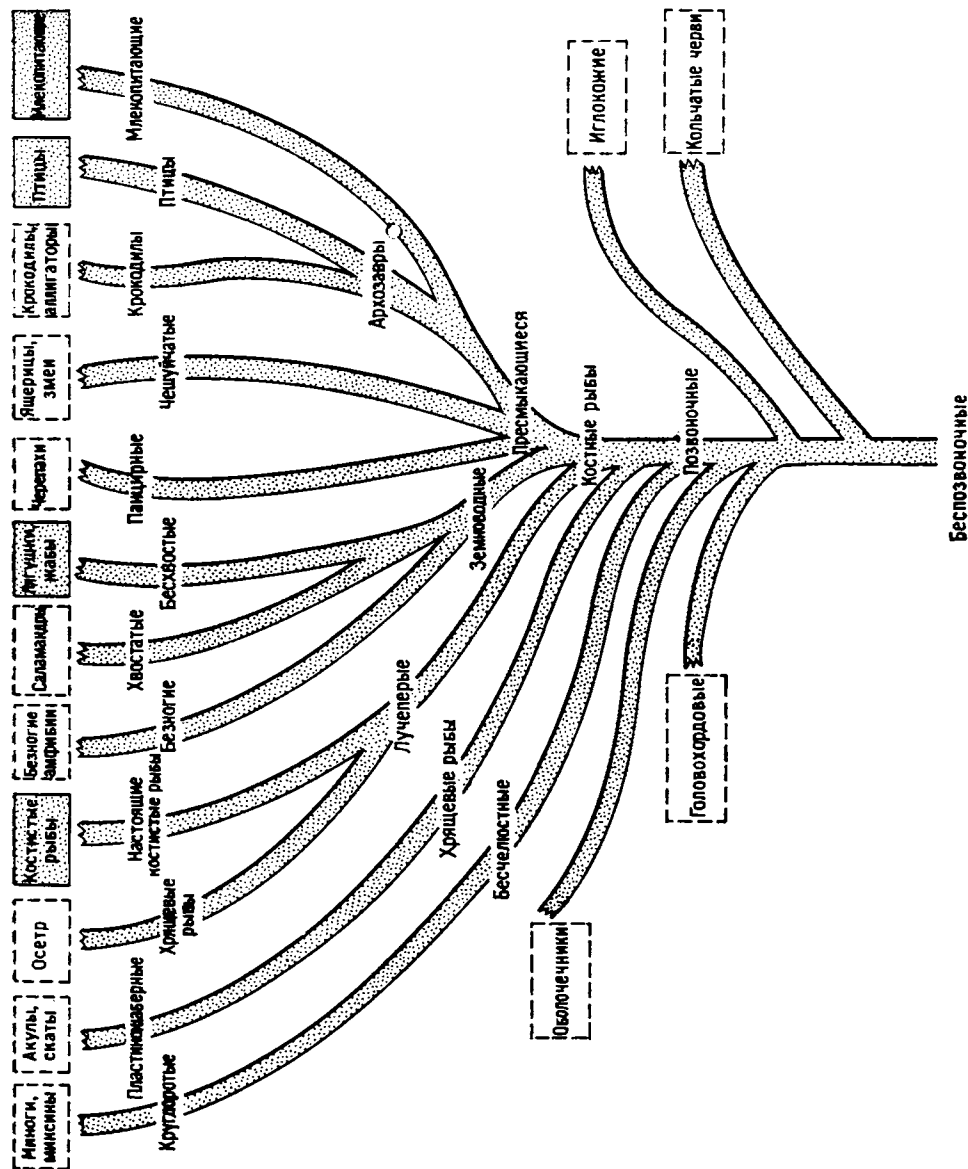


Рис. 15.23. Филогенез главного комплекса гистосовместимости.

Непрерывной линией обведены названия животных, которые, как было показано на основе критериев острого отторжения кожного трансплантата и реакции СКЛ, обладают МНС. Названия тех животных, которые по этим критериям не обладают МНС, но характеризуются хроническим отторжением трансплантата, обведены прерывистой линией. (По [87].)

молекулы класса II, а в первых — молекулы класса I и II. В первом случае различают время острого (быстрого) и хронического (медленного) отторжения. С помощью обмена трансплантата кожи у мышей показано, что две особи, различающиеся по гаплотипу *MHC*, отторгают первичные трансплантаты в течение первых 2 недель; если же особи совпадают по всем аллелям *MHC*, но различаются по одному или более минорным локусам гистосовместимости, то отторжение трансплантатов займет 1—3 месяца, если вообще произойдет. В связи с этим исследователи, занимающиеся эволюционной иммунологией, использовали скорость отторжения трансплантата как не прямой показатель существования *MHC*.

Как показано на рис. 15.23, у всех исследованных видов млекопитающих и птиц выявляется острое отторжение трансплантата между парой аутбредных особей, а их лимфоциты дают реакцию СКЛ [87]. Однако, если двигаться вниз по филогенетическому дереву от теплокровных к холоднокровным позвоночным, наблюдается примечательное изменение этих свойств. Хотя все хордовые способны отторгать трансплантат, что указывает на существование у них иммунной системы, у высших костистых рыб (*Teleostei*) и у бесхвостых амфибий (лягушек) реакция выявляется на сроках острого отторжения, а у всех отрядов рептилий — на сроках хронического отторжения. Все низшие рыбы, такие, как акулы (хрящевые рыбы), миксины и миноги (круглоротые), и все низшие амфибии, такие, как саламандры (хвостатые амфибии) и червяги (безногие, *Apoda*), характеризуются хроническим отторжением подобно рептилиям. Во многих случаях эти результаты подтверждаются при изучении реакции СКЛ. Только лимфоциты костистых рыб и бесхвостых амфибий давали реакцию при смешивании. На самом деле, при исследовании у лягушек (*Xenopus*) F_1 -сибсов аутбредных родителей было установлено, что реакция СКЛ у этого вида контролируется одной кодоминантной генетической областью, с которой ассоциирована способность продуцировать аллоантигена при иммунизациях кожным лоскутом или эритроцитами. Таким образом, у бесхвостых амфибий имеется комплекс генов, обладающих четкой гомологией с генами *MHC* млекопитающих.

Озадачивает в этих наблюдениях лишь одно — это отсутствие реакции СКЛ и отторжения трансплантата у рептилий при наличии весьма убедительных данных о существовании *MHC* как у высших костистых рыб и амфибий, так и у птиц и у млекопитающих. Если рассматривать эти результаты в свете современных представлений об эволюции, можно предположить, что в четырех отдельных случаях развития хордовых произошла конвергентная эволюция. Однако, хотя этого и нельзя исключить, все же такой ход эволюции представляется крайне маловероятным. Скорее похоже на то, что биология и структура *MHC* изучены пока еще недостаточно полно и для изучения эволюционных связей между основными классами подтипа хордовых необходимо исследовать филогенез Т-клеточного распознавания антигенов (первичной функциональной роли молекул *MHC*).

Наконец, нам следует задаться вопросом о том, что возникло раньше, Т-клеточный рецептор или молекулы *MHC*? Из предыдущего обсуждения, очевидно, что этот генетический комплекс (*MHC*), по-видимому, не удастся выявить у многих классов хордовых. В отличие от этого способность отторгать алло-трансплантат можно отметить у высших беспозвоночных, в частности у кольчатых червей и иглокожих. При пересадке дождевым червям трансплантата интегумента от других особей, обитающих в другом географическом районе, трансплантат отторгается в два этапа. Один, неклеточный, включает блокирование ингибиторов лизосомных ферментов, другой, клеточный, — инфильтрацию трансплантата так называемыми коломочитами. Вторичный трансплантат отторгается быстрее, чем первичный, что свидетельствует о наличии памяти.

Коломоциты способны переносить эту анамнестическую функциональную активность интактным червям. Более того, трансплантаты гибридов F_1 , пересаженные родителям, всегда отторгаются. Из этого следует, что распознавание аллоантигенов («не-своего») — процесс, протекающий остро.

Эти эксперименты показали, что дождевые черви (а также морские звезды) обладают иммунной системой с некоторыми признаками Т-клеточной распознающей системы млекопитающих. Циркулирующие клетки обладают иммунологической памятью и специфичностью по отношению к молекулам гистосовместимости. В исследованиях этих беспозвоночных не получено данных о В-лимфоцитах и иммуноглобулин-подобных молекулах, а также о существовании тимуса и МНС. Таким образом, эта система является вероятным предшественником иммунной системы хордовых. Наиболее интригующий момент заключается в том, что даже на ранних этапах развития эта «иммунная система» способна распознавать аллогенные молекулы гистосовместимости. Отсюда можно сделать вывод, что иммунная система произошла, очевидно, от более примитивных систем распознавания, чья функция заключалась не в иммунитете, а в отличении особью «самой себя» от других особей вида.

Опубликованы работы, подтверждающие существование таких клеточных систем аллогенного распознавания у низших беспозвоночных. Люббок [90], например, обнаружил, что колонии морских анемонов *Anthopleura elegantissima* отвечают на контакт с другими колониями того же вида высвобождением акрогайальных нематоцист, которые впиваются во вторгшиеся аллогенные колонии. Для высвобождения нематоцист необходим прямой контакт с тканями «чужого» анемона. Неживые объекты, сингенные ткани или ткани организмов других, неродственных видов не вызывают ответа. Не имеется никаких данных о существовании специфической иммунологической памяти. Интересно, что в выборке из 102 исследованных аллогенных комбинаций только одна комбинация не отвечала высвобождением нематоцист, что указывает на высокий полиморфизм распознающей системы. Однако, представляет ли эта система группу (семейство генов) близкородственных рецепторов, каждый из которых специфичен к представителю другого семейства акцепторных молекул, нужно еще установить с помощью биохимических методов.

Таким образом, вполне вероятно, что предшественником иммунной системы был механизм распознавания других особей вида у ранних многоклеточных. Возможно, этот механизм развился, чтобы предотвратить слияние клеток и поддержать генетическое разнообразие в результате накопления мутаций или обеспечить распространение вида на большей территории с целью снижения конкуренции за источники пищи. Эта система могла также произойти в результате дупликации генов от одной пары рецепторной и акцепторной молекул, которая могла быть использована одноклеточными для примитивного распознавания «своего», чтобы предотвратить саморазрушение своих собственных псевдоподий. Так, может быть, хирург-трансплантолог, он или она, при пересадке органов от одного индивида другому невольно открывает филогенетическое происхождение Т-клеточной распознающей системы, систему антиген-специфических клеточных взаимодействий, основанную на механизме различения «своего» от «несвоего».

Заключение

Данная глава представляет обзор сложной и зачастую противоречивой области клеточной иммунологии, известной как МНС-рестрикция. Хотя в некоторых разделах рассматриваемый вопрос обсуждается довольно детально, чтобы

читатель мог взвесить все «за и против» при обсуждении конкретных данных, этот подход иногда вносит больше путаницы, чем ясности. Поэтому ниже будут суммированы в общих чертах наиболее важные моменты.

- I. 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.
- II. У животных F_1 представлены две или более Т-клеточные субпопуляции, специфичные к одному и тому же чужеродному антигену, но в ассоциации с разными продуктами генов *МНС*.
- III. Анализ Т-клеточных клонов показал, что МНС-рестрикция является прямым следствием двойной специфичности Т-клеточного рецептора к антигену и молекуле МНС. Число генов, рецепторов и антигенсвязывающих центров, необходимых для построения Т-клеточного рецептора, неизвестно.
- IV. Различные субпопуляции Т-клеток рестриктированы по разным молекулам МНС. Цитотоксические Т-клетки распознают молекулы класса I. Хелперные Т-клетки распознают один вид молекул класса II (кодируемые в субобластях *I-A* и *I-E* у мышей), а некоторые типы супрессорных Т-клеток распознают другой вид молекул МНС класса II (кодируемые в субобластях *I-J* и *I-C* у мышей).
- V. Происхождение МНС-рестрикции остается спорным. Онтогенетическая гипотеза, основывающаяся главным образом на экспериментах с химерами F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.), утверждает, что положительная селекция Т-клеточного репертуара по способности распознавать собственные молекулы МНС происходит во время дифференцировки в тимусе, т. е. в отсутствие чужеродного антигена. Гипотеза первичной иммунизации («примирования»), основывающаяся главным образом на экспериментах по острому истощению, утверждает, что положительная селекция происходит на периферии во время антигенной стимуляции.
- VI. Т-клеточный репертуар с высокой частотой включает клетки (1—5%), специфичные к молекулам клеточной поверхности аллогенных особей (других представителей того же вида). Эти клетки вызывают отторжение трансплантата. Такие клетки возникают как вторичное следствие МНС-рестриктированного распознавания либо в результате перекрестной реактивности на уровне рецептора, либо в результате геномного механизма генерации клонального разнообразия рецепторов.
- VII. Неизвестно, почему молекулы МНС служат рестриктирующими элементами. Однако существуют предположения, что эти трансмембранные белки действуют как специфичные для Т-лимфоцитов белки клеточных взаимодействий, которые передают сигнал от определенного Т-лимфоцита внутрь клетки-мишени. Предполагается, что высокая степень полиморфизма на популяционном уровне, проявляемая этими молекулами, лежит в основе важного механизма сопротивления внутриклеточным паразитам, который мог произойти от механизма распознавания других особей того же вида у примитивных многоклеточных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness, *Adv. Immunol.*, 27, 51—177 (1979).
2. Berzofsky J. A. Immune response genes in the regulation of mammalian immunity. In: *Biological Regulation and Development*, Vol. 2, ed. by R. F. Goldberger, pp. 467—594, Plenum Press, New York, 1980.

3. Schwartz R. H. Functional properties of I region gene products and theories of immune response (Ir) gene function. In: *Ia Antigens*, Vol. 1: Mice, ed. by S. Ferrone and C. S. David, pp. 161—218, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
4. Klein J., Nagy Z. A. MHC restriction and Ir genes, *Adv. Cancer Res.*, **37**, 234—317 (1982).
5. Katz D. H., Hamaoka T., Benacerraf B. Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. Failure of physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates, *J. Exp. Med.*, **137**, 1405—1418 (1973).
6. Katz D. H., Graves M., Dorf M. E., Dimuzio H., Benacerraf B. Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. VII. Cooperative responses between lymphocytes are controlled by genes in the I region of the H-2 complex, *J. Exp. Med.*, **141**, 263—268 (1975).
7. Rosenthal A. S., Shevach E. M. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **138**, 1194—1212 (1973).
8. Yano A., Schwartz R. H., Paul W. E. Antigen presentation in the murine T-lymphocyte proliferative response. I. Requirement for genetic identity at the major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, **146**, 828—843 (1977).
9. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system, *Nature*, **248**, 701—702 (1974).
10. Shearer G. M., Rhen T. G., Garbarino C. A. Cell mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, **141**, 1348—1364 (1975).
11. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis, *Nature*, **251**, 547—548 (1974).
12. Koszinowski U., Ertl H. Lysis mediated by T cells and restricted by H-2 antigen of target cells infected with vaccinia virus, *Nature*, **255**, 552—554 (1975).
13. Zinkernagel R. M. H-2 compatibility requirement for virus specific, T-cell-mediated cytotoxicity. The H-2K structure involved is coded by a single cistron defined by H-2K^b mutant mice, *J. Exp. Med.*, **143**, 437—443 (1976).
14. Forman J., Coodenow R. S., Hood L., Ciavarra R. Use of DNA-mediated gene transfer to analyze the role of H-2L^d in controlling the specificity of anti-vesicular stomatitis virus cytotoxic T cells, *J. Exp. Med.*, **157**, 1261—1272 (1983).
15. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D, *J. Exp. Med.*, **141**, 1427—1436 (1975).
16. Paul W. E., Shevach E. M., Pickeral S., Thomas D. W., Rosenthal A. S. Independent populations of primed F₁ guinea pig T lymphocytes respond to antigen-pulsed parental peritoneal exudate cells, *J. Exp. Med.*, **145**, 618—630 (1977).
17. Sprent J. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice in vivo, *Immunol. Rev.*, **42**, 108—137 (1978).
18. Sredni B., Schwartz R. H. Antigen-specific, proliferating T lymphocyte clones, Methodology, specificity, MHC restriction and alloreactivity, *Immunol. Rev.*, **54**, 187—224 (1981).
19. Kimoto M., Beck B., Shigeta M., Fathman C. G. Functional characterization of hybrid Ia antigens. In: *Ia Antigens*, Vol. 1: Mice, ed. by S. Ferrone and C. S. David, pp. 81—104, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
20. McDougal J. S., Cort S. P. Generation of T helper cells in vitro. IV. F₁ T helper cells primed with antigen-pulsed parental macrophages are genetically restricted in their antigen-specific helper activity, *J. Immunol.*, **120**, 445—451 (1978).
21. Asano Y., Shigeta M., Fathman C. G., Singer A., Hodes R. Role of the major histocompatibility complex in T cell activation of B cell subpopulations. A single monoclonal T helper cell population activates different B cell subpopulations by distinct pathways, *J. Exp. Med.*, **156**, 350—360 (1982).
22. Von Boehmer H., Hudson L., Sprent J. Collaboration of histocompatible T and B lymphocytes using cells from tetraparental bone marrow chimeras, *J. Exp. Med.*, **142**, 989—997 (1975).
23. 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.*, **142**, 928—935 (1975).
24. Pfizenmaier K., Starzinski-Powitz A., Rodt H., Röllinghoff M., Wagner H. Virus and trinitrophenyl hapten-specific T-cell-mediated cytotoxicity against H-2 incompatible target cells, *J. Exp. Med.*, **143**, 999—1004 (1976).

25. Zinkernagel R. M. H-2 restriction of virus-specific cytotoxicity across the H-2 barrier. Separate effector T-cell specificities are associated with self-H-2 and with tolerated allogeneic H-2 in chimeras, *J. Exp. Med.*, **144**, 933—945 (1976).
26. Sprent J., Von Boehmer H. T-helper function of parent $\rightarrow$ F₁ chimeras. Presence of a separate T-cell subgroup able to stimulate allogeneic B cells but not syngeneic B cells, *J. Exp. Med.*, **149**, 387—397 (1979).
27. Kindred B. Can tolerant allogeneic cells restore nude mice? *Cell. Immunol.*, **20**, 241—246 (1975).
28. Katz D. H. The role of the histocompatibility complex in lymphocyte differentiation, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **41**, 611—624 (1977).
29. Bevan M. J. In a radiation chimera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells, *Nature*, **269**, 417—418 (1977).
30. Zinkernagel R. M., Klein P. A., Klein J. Hostdetermined T-cell fine specificity for self-H-2 in radiation bone-marrow chimeras of C57BL/6 (H-2^b), Mutant H-2^{ba}, and F₁ mice, *Immunogenetics*, **7**, 73—77 (1978).
31. Sprent J. Restricted helper function of F₁ parent bone marrow chimeras controlled by K-end of H-2 complex, *J. Exp. Med.*, **147**, 1838—1842 (1978).
32. 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*, **271**, 251—253 (1978).
33. 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.*, **147**, 882—896 (1978).
34. Miller J. F. A. P., Gamble J., Mottram P., Smith F. I. Influence of thymus genotype on acquisition of responsiveness in delayed-type hypersensitivity, *Scand. J. Immunol.*, **9**, 29—38 (1979).
35. Bennink J. R., 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.*, **148**, 128—135 (1978).
36. Doherty P. C., Bennink J. R. 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.*, **149**, 150—157 (1979).
37. Blanden R. V., Andrew M. E. Primary anti-viral cytotoxic T-cell responses in semiallogeneic chimeras are not absolutely restricted to host H-2 type, *J. Exp. Med.*, **149**, 535—538 (1979).
38. 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. USA*, **77**, 7390—7394 (1980).
39. Smith F. I., Miller J. F. A. P. Suppression of T cells specific for the nonthymic parental H-2 haplotype in thymus-grafted chimeras, *J. Exp. Med.*, **151**, 246—251 (1980).
40. Blanden R. V., Ashman R. B., O'Neill H. C., Woodhams C. E., Kees U. R., Andrew M. E. Incomplete tolerance to MHC antigens in irradiation chimeras: Implications for MHC restriction and self tolerance, *Immunol. Rev.*, **58**, 25—36 (1981).
41. Zinkernagel R. M., Althage A. Search for suppression of T cells specific for the second nonhost H-2 haplotype in F₁ $\rightarrow$ P irradiation bone marrow chimeras, *J. Immunol.*, **122**, 1742—1749 (1979).
42. Hünig T. R., Bevan M. J. Antigen recognition by cloned cytotoxic T lymphocytes follows rules predicted by the altered-self hypothesis, *J. Exp. Med.*, **155**, 111—125 (1982).
43. Hedrick S. M., Matis L. A., Hecht T. T., Samelson L. E., Longo D. E., Heber-Katz E., Schwartz R. H. The fine specificity of antigen and Ia determinant recognition by T cell hybridoma clones specific for pigeon cytochrome c, *Cell*, **30**, 141—152 (1982).
44. Heber-Katz E., Schwartz R. H., Matis L. A., Hannum C., Fairwell T., Appella E., Hansburg D. Contribution of antigen-presenting cell major histocompatibility complex gene products to the specificity of antigen-induced T cell activation, *J. Exp. Med.*, **155**, 1086—1099 (1982).
45. 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.*, **148**, 84—92 (1978).
46. Singer A., Hathcock K. S., Hodes R. J. Self recognition in allogeneic radiation bone marrow chimeras. A radiation-resistant host element dictates the self specificity and immune response gene phenotype of T-helper cells, *J. Exp. Med.*, **153**, 1286—1301 (1981).
47. Kindred B. Lymphocytes which differentiate in an allogeneic thymus. III. Parental T cells which differentiate in an allogeneic or semiallogeneic thymus help only B cells of their own genotype, *Cell. Immunol.*, **51**, 64—71 (1980).
48. Hedrick S. M., Watson J. Genetic control of the immune response to collagen. III. Coordi-

- nate restriction of cellular cooperation and antigen responsiveness by thymus-directed maturation, *J. Immunol.*, **125**, 1782—1788 (1980).
49. *Singer A., Hathcock K. S., Hodes R. J.* Self recognition in allogeneic thymic chimeras. Self recognition by T helper cells from thymus-engrafted nude mice is restricted to the thymic H-2 haplotype, *J. Exp. Med.*, **155**, 339—344 (1982).
 50. *Maryanski J. L., MacDonald H. R., Sordat B., Cerottini J.-C.* Cytolytic T lymphocyte precursor cells in congenitally athymic C57BL/6 nu/nu mice: Quantitation, enrichment, and specificity, *J. Immunol.*, **126**, 871—876 (1981).
 51. *Hünig T., Bevan M. J.* Specificity of cytotoxic T cells from athymic mice, *J. Exp. Med.*, **152**, 688—702 (1980).
 52. *Jenkinson E. J., van Ewijk W., Owen J. J. T.* Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice, *J. Exp. Med.*, **153**, 280—292 (1981).
 53. *Scheid M. P., Goldstein G., Boyse E. A.* Differentiation of T cells in nude mice, *Science*, **190**, 1211—1213 (1975).
 54. *Zinkernagel R. M., Callahan G. N., Althage A., Cooper S., Streilein J. W., Klein J.* The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: Evidence of T help, *J. Exp. Med.*, **147**, 897—911 (1978).
 55. *Longo D. L., Schwartz R. H.* Gene complementation. Neither Ir-GL $\emptyset$ gene need be present in the proliferative T cell to generate an immune response to poly (Glu⁵⁶Lys³⁶Phe⁹)_n, *J. Exp. Med.*, **151**, 1452—1467 (1980).
 56. *Sprent J.* Features of cells controlling H-2 restricted presentation of antigen to T helper cells in vivo, *J. Immunol.*, **125**, 2089—2096 (1980).
 57. *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*, **287**, 44—46 (1980).
 58. *Zinkernagel R. M.* Selection of restriction specificities of virus-specific cytotoxic T cells in the thymus: No evidence for a crucial role of antigen-presenting cells, *J. Exp. Med.*, **156**, 1842—1847 (1982).
 59. *Tada T., Okumura K.* The role of antigen specific T cell factors in the immune response, *Adv. Immunol.*, **28**, 1—87 (1979).
 60. *Flood P. M., Yamauchi K., Singer A., Gershon R. K.* Genetic restrictions between T cell subsets are generated in the thymus, *Behring Inst. Res. Commun.*, **70**, 213—217 (1982).
 61. *Katz D. H., Skidmore B. J., Katz L. R., Bogowitz C. A.* Adaptive differentiation of murine lymphocytes. I. Both T and B lymphocytes differentiating in F₁ → parental chimeras manifest preferential cooperative activity for partner lymphocytes derived from the same parental type corresponding to the chimeric host, *J. Exp. Med.*, **148**, 727—745 (1978).
 62. *Sprent J., Bruce J.* Lymphoid function in F₁ → parent chimeras. Lack of evidence for adaptive differentiation of B cells or antigen-presenting cells, *J. Exp. Med.*, **150**, 715—720 (1979).
 63. *Singer A., Hodes R. J.* Major histocompatibility complex-restricted self-recognition in responses to trinitrophenyl-ficoll. Adaptive differentiation and self-recognition by B cells, *J. Exp. Med.*, **156**, 1415—1434 (1982).
 64. *Wyllie D. E., Sherman L. A., Klinman N. R.* Participation of the major histocompatibility complex in antibody recognition of viral antigens expressed on infected cells, *J. Exp. Med.*, **155**, 403—414 (1982).
 65. *Simonsen M.* The clonal selection hypothesis evaluated by grafted cells reacting against their hosts, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **32**, 517—523 (1967).
 66. *Payne L. N., Jaffe W. P.* Graft-against-host reactions produced in chick embryos with blood from heterologous avian donors, *Transplant. Bull.*, **30**, 20—25 (1962).
 67. *Ryser J.-E., MacDonald H. R.* Limiting dilution analysis of alloantigen-reactive T lymphocytes I. Comparison of precursor frequencies for proliferative and cytolytic responses, *J. Immunol.*, **122**, 1691—1696 (1979).
 68. *Jerne N.* The somatic generation of immune recognition, *Eur. J. Immunol.*, **1**, 1—9 (1971).
 69. *Heber-Katz E., Wilson D. B.* Sheep red blood cell-specific helper activity in rat thoracic duct lymphocyte populations positively selected for reactivity to specific strong histocompatibility alloantigens, *J. Exp. Med.*, **143**, 701—706 (1976).
 70. *Schmitt-Verhulst A.-M., Shearer G. M.* Bifunctional major histocompatibility-linked genetic regulation of cell-mediated lympholysis to trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **142**, 914—927 (1975).
 71. *Lemonnier F., Burakoff S. J., Germain R. N., Benacerraf B.* Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1229—1233 (1977).
 72. *Bevan M. J.* Killer cells reactive to altered-self antigens can also be alloreactive, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2094—2098 (1977).

73. Von Boehmer H., Hengartner H., Nabholz M., Lernhardt W., Schreier M. H., Haas W. Fine specificity of a continuously growing killer cell clone specific for H-Y antigen, *Eur. J. Immunol.*, 9, 592—597 (1979).
74. Sredni B., Schwartz R. H. Alloreactivity of an antigen-specific T-cell clone, *Nature*, 287, 855—857 (1980).
75. Schwartz R. H., Sredni B. Alloreactivity of antigen-specific T cell clones. In: *Isolation Characterization and Utilization of Lymphocyte Clones*, ed. by C. G. Fathman and F. Fitch, pp. 375—384, Academic Press, New York, 1982.
76. Hünig T., Bevan M. Self H-2 antigens influence the specificity of alloreactive cells, *J. Exp. Med.*, 151, 1288—1298 (1980).
77. Weksler M. E., Kozak R. Lymphocyte transformation induced by autologous cells. V. Generation of immunologic memory and specificity during the autologous mixed lymphocyte reaction, *J. Exp. Med.*, 146, 1833—1838 (1977).
78. Glimcher L. H., Longo D. H., Green I., Schwartz R. H. Murine syngeneic mixed lymphocyte response. I. Target antigens are self Ia molecules, *J. Exp. Med.*, 154, 1652—1670 (1981).
79. Jamashita U., Shevach E. M. The syngeneic mixed leukocyte reaction: the genetic requirements for the recognition of self resemble the requirements for the recognition of antigen in association with self, *J. Immunol.*, 124, 1773—1778 (1980).
80. Schwartz R. H., Glimcher L. H., Hedrick S. M., Singer A., Longo D. H. Restriction to thymic major histocompatibility complex (MHC)-and immune response (Ir)-phenotype of T cells from allogeneic chimeras, *Behring Inst. Res. Commun.*, 70, 155—162 (1982).
81. Glimcher L. H., Shevach E. M. Production of autoreactive I region-restricted T cell hybridomas, *J. Exp. Med.*, 156, 640—645 (1982).
82. Langman R. E. Cell-mediated immunity and the major histocompatibility complex, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 81, 1—37 (1978).
83. Cohn M., Epstein R. T-cell inhibition of humoral responsiveness. II. Theory on the role of restrictive recognition in immune regulation, *Cell Immunol.*, 39, 125—153 (1978).
84. Cohn M., Langman R. The T-cell receptor: Multitudes in the valley of decision, *Behring Inst. Res. Commun.*, 70, 219—241 (1982).
85. Klein J., Figueroa F. Polymorphism of the mouse H-2 loci, *Immunol. Rev.*, 60, 23—57 (1981).
86. Shinohara N., Sachs D. H. Interspecies cross-reactions of murine anti-Ia alloantibodies. In: *Ia Antigens*, Vol. I, Mice, ed. by S. Ferrone and C. S. David, pp. 219—240, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
87. Klein J. Evolution and function of the major histocompatibility system: Factors and speculations. In: *The Major Histocompatibility system in Man and Animals*, ed by D. Götze, pp. 339—378, Springer-Verlag, Berlin, 1977.
88. Cohen N., Collins N. H. Major and minor histocompatibility systems of ectothermic vertebrates. In: *The Major Histocompatibility System in Man and Animals*, ed. by D. Götze, pp. 313—337, Springer Verlag, Berlin, 1977.
89. Valembois P. Cellular aspects of graft rejection in earthworm and some other metazoa, *Contemp. Top. Immunobiol.*, 4, 121—126 (1974).
90. Lubbock R. Clone-specific cellular recognition in a sea anemone., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6667—6669 (1980).
91. Sprent J. Restricted helper function of F₁ hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. I. Failure to collaborate with B cells of the opposite parental strain not associated with active suppression, *J. Exp. Med.*, 147, 1142—1158 (1978).
92. Sprent J. Two subgroups of T helper cells in F₁ hybrid mice revealed by negative selection to heterologous erythrocytes in vivo, *J. Immunol.*, 121, 1691—1695 (1978).
93. Katz D. H., Hamaoka T., Dorf M. E., Benacerraf B. Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. The H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2624—2628 (1973).

Гены иммунного ответа

Уильям Е. Пол

(William E. Paul)

Иммунный ответ на многие простые антигены контролируется генами, кодирующимися в области *I* или, в некоторых случаях, в областях *K* и *D* главного комплекса гистосовместимости (МНС) у мышей и соответствующих локусов у других видов [1]. Гены, ответственные за этот контроль, называются генами иммунного ответа (генами *Ir*). В этой главе изложены современные представления о феноменах, контролируемых генами *Ir*, раскрываются природа белковых продуктов этих генов и механизмы, с помощью которых продукты этих генов регулируют ответ на специфические антигены.

Согласно современным представлениям, контроль иммунного ответа генами *Ir* непосредственно связан с регуляцией клеточных взаимодействий МНС. Эти вопросы в деталях изложены в главе 15. Читателю следует рассматривать эту главу как введение к обсуждению *Ir*-генов.

16.1. Феноменология контроля, осуществляемого генами *Ir*

16.1.1. Открытие генов *Ir*

Контроль иммунного ответа генами *Ir* был обнаружен при изучении иммуногенности полимеров простых аминокислот. Бенацераф и др. [2] установили, что гиперчувствительность замедленного типа и ответ антител на гаптенные производные поли-L-лизина, а именно динитрофенилированный поли-L-лизин (ДНФ-PLL) и сополимер L-глутаминовой кислоты и L-лизина (GL), встречаются у некоторых, но не у всех особей аутбредной популяции морских свинок. Гибридологический анализ показал, что ответ на перечисленные антигены определяется группой сцепленных генов. Это было окончательно установлено при исследовании иммунореактивности инбредных линий морских свинок. Морские свинки линии 2 отвечали на ДНФ-PLL и GL, тогда как морские свинки линии 13 не отвечали на оба антигена; гибриды F_1 (2×13) были способны отвечать на ДНФ-PLL и GL (т. е. признак отвечаемости был доминантным). 50% особей среди потомства от возвратного скрещивания гибридов F_1 с морскими свинками линии 13 были способны к иммунному ответу [3]. Эти результаты свидетельствуют о том, что одна сегрегирующаяся генетическая область отвечает за линейные различия морских свинок 2 и 13 в иммунореактивности на ДНФ-PLL и GL.

Анализ ответа инбредных морских свинок на сополимер L-глутаминовой кислоты и L-тирозина (GT) показал, что различия в отвечаемости между линия-

ми 2 и 13 также определяются одним генетическим районом [4]. В этом случае морские свинки линии 13 отвечали, а линии 2 не отвечали на GT, что указывает на высокую специфичность контроля иммунного ответа генами *Ir*.

16.1.2. Гены *Ir* локализируются в главном комплексе гистосовместимости

Мак-Девитт и Села [5] продемонстрировали сходный генетический контроль ответа инбредных мышей на различные полимеры аминокислот с разветвленной цепью. Эти полимеры состоят из каркаса поли-L-лизина, который связан с сополимерами D,L-аланина через ε-аминогруппы остатков лизина. Короткие сополимеры L-глутаминовой кислоты с L-тирозином или L-гистидином соединены с концевой α-аминогруппой сополимера D, L-аланина. Тирозинсодержащий полимер обозначается (T, G)-A—L, а гистидинсодержащий полимер — (H, G)-A—L. Мыши C57BL/6 продуцируют антитела IgG в ответ на (T, G)-A—L, но не на (H, G)-A—L, тогда как мыши СВА отвечают на (H, G)-A—L, но не на (T, G)-A—L. Иммунореактивность детерминируется аутосомным доминантным геном. В решающем эксперименте было показано, что этот ген сцеплен с *MHC* [6]. Первоначально область *I MHC* была выявлена в результате генетического картирования генов *Ir*, выполненного Мак-Девиттом и др. [6]. В табл. 16.1 приведены данные об иммунореактивности на (H, G)-A—L и

Таблица 16.1. Гены *Ir* картируются в области *I* главного комплекса гистосовместимости (по [6])

Линии мышей	<i>MHC</i> ¹⁾					Иммунореактивность	
	<i>K</i>	<i>I-A</i>	<i>I-E</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	(T, G)-A—L	(H, G)-A—L
C57BL/6	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	+	—
B10.A	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	—	+
B10.A (4R)	<i>k</i>	<i>k/</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	—	+
B10.A (5R)	<i>b</i>	<i>b/</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	+	—
DBA/1	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	—	—
AQR	<i>q</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	—	+

¹⁾ *K*, *I-A*, *I-E*, *S*, *D* являются областями и субобластями *MHC*. Строчные буквы обозначают аллельные формы этих районов, представленные у перечисленных линий мышей.

(T, G)-A—L инбредных линий мышей, которые имеют *MHC*-области, образованные рекомбинацией между гаплотипами *MHC H-2^a* и *H-2^b* и *H-2^a* и *H-2^d*. (Генетическая организация *MHC* мыши обсуждается в гл. 13.) Результаты, полученные при иммунизации этих мышей, а также в сходных экспериментах с использованием других антигенов, позволили локализовать гены *Ir* в области *I*. В случае ответа на (H, G)-A—L и на (T, G)-A—L эти гены картировались в определенном участке *MHC*, а именно в субобласти *I-A*. Ген *Ir*, контролирующий ответ на эти антигены, был обозначен *Ir-1*.

Факт локализации генов, контролирующих иммунореактивность на специфические антигены в той же самой генетической области, которая ответственна и за регуляцию трансплантационных реакций, вызвал несомненно большой интерес и помог установить центральную роль *MHC* в тимусзависимом иммунном ответе.

16.1.3. Гены *Ir* локализуются в двух различных субобластях

Детальное изучение иммунного ответа на различные антигены показало, что контроль иммунного ответа генами *Ir* главного комплекса гистосовместимости является общим правилом. Ответ на многие антигены контролируется геном (генами), локализованным в субобласти *I-A*, т. е. в той же самой области *МНС*, в которой картирован и *Ir-1*. Ответ на вторую большую группу антигенов контролируется генами *Ir*, картируемыми в субобласти *I-E МНС*. Как правило, для иммунного ответа, который контролируется генами *Ir*, ассоциированными с *I-E*, требуется также наличие «отвечающего» аллеля субобласти *I-A МНС*. Таким образом, гены *Ir*, кодируемые в субобласти *I-E*, являются частью комплементирующей пары генов *Ir*; для развития ответа необходимы «отвечающие» аллели и того и другого локуса [7].

Таблица 16.2. Антигены, ответ на которые контролируется генами *Ir* области *I* мышей (по [10])

Антиген	Локус	Отвечающий гаплотип
Полимеры аминокислот poly (Glu ⁶⁰ Ala ³⁰ Tyr ¹⁰) poly (Glu ⁵⁷ Lys ³⁸ Ala ⁵) poly (Glu ⁵⁸ Lys ³⁸ Phe ⁹) poly (Glu ⁵⁷ Lys ³⁸ Tyr ⁵) (T, G)-A — L (Phe, G)-A — L	<i>I-A</i> <i>I-A</i> <i>I-A</i> и <i>I-E</i> <i>I-A</i> и <i>I-E</i> <i>I-A</i> <i>I-A</i>	<i>a, b, d, f, k, r, u, v</i> <i>a, d, f, j, s</i> <i>d, j, p, q, r, u</i> <i>d, j, r, u</i> <i>b, d</i> <i>a, b, d, j, k, p, q</i>
Белки Бычий инсулин Лизоцим куриных яиц Миоглобин кашалота Свиной цитохром <i>c</i>	<i>I-A</i> <i>I-A</i> <i>I-A (Ir-Mb)</i> <i>I-A</i> и <i>I-E</i>	<i>b, d</i> <i>a, k, q</i> <i>d</i> <i>a, k</i>
Аллоантигены: Thy- 1.1 Н-У антиген самцов Миеломный IgG (BALB/c) Миеломный IgA (BALB/c)	<i>I-A</i> <i>I-B</i> <i>I-B</i> <i>I-A</i>	<i>q</i> <i>b, d, s</i> <i>b, p, r, s, v</i> <i>a, k, p, r, s</i>

Гены *Ir* также были картированы в субобласти *I-B МНС* [8]. Поскольку до сих пор не обнаружен белковый продукт этого локуса и не установлено рестрикционного полиморфизма ДНК, относящейся к субобласти *I-B*, был сделан вывод о том, что локализация этих генов *Ir* в субобласти *I-B* (между *I-A* и *I-J*) только кажущаяся. Получены данные о том, что некоторые случаи генетического контроля, ассоциированного с *I-B*, отчасти обусловлены сложными клеточными механизмами, в которых на разных уровнях участвуют гены *I-A* и *I-E* [9].

В табл. 16.2 приведены данные о ряде генов *Ir* и субобластях *МНС*, в которых они картируются.

16.1.4. Антигены, ответ на которые контролируется генами *Ir*

Открытие генов *Ir* способствовали работы, показавшие, что отдельные особи или линии животных не отвечают на антигены, на которые отвечают другие представители вида. Определяемые таким способом гены *Ir*, как правило, контролируют ответ на «простые» антигены. Среди этих антигенов: а) полимеры аминокислот, такие, как линейные сополимеры (например, GL или GT) и полимеры с разветвленной цепью (например, (T, G)-A—L и (H, G)-A—L; б) чистые белки, как правило, с небольшой молекулярной массой — особенно при иммунизации низкими дозами (например, инсулин, цитохром с); в) аллоантигены (например, антигены гистосовместимости, иммуноглобулины) (табл. 16.2). Иммуногены каждой группы оказываются простыми антигенами по отношению к иммунизируемой особи. Полимеры аминокислот обладают простой структурой и могут содержать ограниченное число антигенных детерминант. Простые белки при введении в низких дозах, по-видимому, представляют реципиенту наиболее «антигенные» детерминанты. Аллоантигены, хотя и являются зачастую крайне сложными молекулами, отличаются только одним или ограниченным числом антигенных детерминант от сходных молекул у иммунизируемой особи. Таким образом, в антигенном отношении они также являются простыми структурами. Из этого анализа вытекает, что можно выявить контроль иммунного ответа на антиген по типу «всё или ничего» в случае распознавания одного или ограниченного числа антигенных сайтов. В свою очередь из этого следует, что на сложные антигены не распространяется контроль по типу «всё или ничего», поскольку они представляют иммунной системе много антигенных детерминант. Итак, процессы, контролируемые генами *Ir*, можно распространить на все антигены, но этот контроль обычно не выявляется, поскольку большинство сложных антигенов вызывают ответ практически у всех представителей вида.

16.1.5. Типы иммунного ответа, контролируемые генами *Ir*

Ir-гены контролируют: а) тимусзависимый антительный ответ, б) развитие гиперчувствительности замедленного типа, в) генерацию МНС-рестриктированных хелперных, пролиферирующих и лимфокин-секретирующих Т-клеток. и г) созревание антиген-специфических цитотоксических Т-клеток. Как правило, на тимуснезависимый антительный ответ контроль генами *Ir* не распространяется [11]. Генерация так называемых Th_2 -хелперных Т-клеток, которые, по-видимому, специфичны к антигенным детерминантам иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов, также не контролируется генами *Ir* [12].

16.1.5.1. Т-клеточный ответ, зависящий от генов *Ir*, рестриктирован по продуктам МНС

Контроль иммунного ответа генами *Ir* проявляется в тех случаях, когда МНС-рестриктированные Т-клетки играют основную роль. Это указывает, что контроль генами *Ir* затрагивает дифференцировку или активацию таких Т-клеток. Действительно, как подробно обсуждалось в гл. 15, МНС-рестриктированные Т-клетки сочетанно распознают детерминанты (*эпитопы*) чужеродного антигена и «рестриктирующих элементов», кодируемых МНС [13]. Детерминанты рестриктирующих элементов, которые сочетанно распознаются Т-клетками, были названы *гистотопами* [14]. Гены, контролирующие рестриктирую-

щие элементы, картируются в тех же самых областях генома, в которых локализованы гены и молекулы МНС класса II (т. е. в *I-A*- и *I-E*- субобластях МНС). В самом деле, как описано в гл. 15, в настоящее время получены веские доводы в пользу того, что рестриктирующие элементы представлены молекулами МНС класса II, которые в свою очередь являются продуктами генов *Ir*, ассоциированных с областью *I*. Эти доказательства мы обсудим позже.

Установлению общности *Ir*-генного контроля и МНС-рестрикции клеточных взаимодействий в значительной степени способствовало изучение этих феноменов иммунного ответа в простых системах *in vitro*. Из них для анализа рестрикции по области *I* наиболее широко используется антиген-специфическая стимуляция секреции лимфокинов, таких, как интерлейкин 2 (IL-2), и пролиферативный ответ иммунных Т-клеток (или длительно культивируемых Т-клеточных линий). Изучение рестрикции по областям *K*, *D* и генам *Ir*, кодируемым в этих районах, в основном связано с исследованиями цитотоксического действия Т-клеток на соответствующие клетки-мишени.

Большинство данных, лежащих в основе современных представлений о роли генов МНС в иммунном ответе, были получены при изучении выделенных от животных гетерогенных популяций активированных Т-клеток. Эти эксперименты были повторены при исследовании длительно культивируемых антиген-специфических Т-клеточных линий и антиген-специфических Т-клеточных гибридов. Поскольку такие популяции клеток зачастую клонированы и, следовательно, являются гомогенными, полученные при их изучении результаты более убедительны и, как правило, позволяют сделать однозначные выводы.

Пролиферативный ответ *in vitro* активированных Т-клеток и Т-клеточных линий, полученных на их основе, можно индуцировать только в присутствии специализированных антиген-презентирующих клеток (АПК) [15]. Клетками с антиген-презентирующей функцией являются макрофаги, несущие молекулы МНС класса II [16], дендритные клетки [17], эпителиальные клетки Лангерганса [18] и многие линии В-лимфом [19], а также при некоторых условиях и нормальные В-лимфоциты [20]. Общее свойство каждого вида этих клеток — это экспрессия молекул МНС класса II.

Как уже отмечалось, Т-клетки сочетанно распознают эпитопы антигена вместе с гистотопами, экспрессированными рестриктирующими элементами. Т-клетки и Т-клеточные линии, полученные от иммунных животных, как правило, узнают эпитопы антигена в ассоциации с гистотопами рестриктирующих элементов того же гаплотипа МНС, который обнаруживается у животного — донора активированных Т-клеток. Например, Т-клеточная линия, полученная от иммунных к овальбумину (ОА) мышей В10.А, будет специфична к эпитопам ОА и гистотопам, экспрессированным на рестриктирующих элементах АПК мышей В10.А.

Открытие сочетанной специфичности индивидуальных Т-клеток к данному антигенному эпитопу и данному гистотопу рестриктирующего элемента позволило сделать очевидное предположение, что специфичные к ОА Т-лимфоциты гибридных мышей F_1 , гетерозиготных по субобластям *I-A* и *I-E*, представлены определенными популяциями клеток, сочетанно специфичных к гистотопам всех рестриктирующих элементов гетерозиготных животных. В самом деле, если мы ограничимся исследованием Т-клеток, специфичных к эпитопам ОА и гистотопам молекул *I-A*, то следует ожидать экспрессию двух классов Т-клеток мышей F_1 (В10.А $\times$ В10): одни Т-клетки распознают ОА в сочетании с гистотопами рестриктирующих элементов $I-A^b$ (В10.А), а другие — $I-A^b$ (В10). Как описано в гл. 15, Т-клетки обоих типов действительно существуют [21]. Кроме того, обнаружены Т-клеточные клоны, которые распознают эпитопы

ОА и гистотопы, представленные на поверхности гетерозиготной клетки мышей F_1 , но не мышей B10.A и B10. Это свидетельствует о возможном формировании рестриктирующих элементов продуктами альтернативных аллельных вариантов генов *I-A* [22]. Молекулы МНС класса II состоят из двух цепей (α и β), которые кодируются в области *I*. Ген, определяющий α -цепь молекулы *I-A*, называется A_α . Ген A_β кодирует β -цепь молекулы *I-A* (подробно структура молекул МНС класса II изложена в гл. 14). Поскольку продукты аллелей A_α и A_β сестринских хромосом могут соединяться, образуя новые молекулы МНС класса II [23, 24], вполне резонным кажется вывод о том, что распознаваемые Т-клетками уникальные « F_1 -специфичные» рестриктирующие элементы являются молекулами МНС класса II. Развивая это положение, можно утверждать, что все кодируемые в области *I* рестриктирующие элементы представляют собой молекулы МНС класса II.

16.1.5.2. Т-клетки, специфичные к антигену в сочетании с рестриктирующими элементами неответающего гаплотипа, не выявляются

Проведенный сходный анализ специфичности Т-клеток к антигенам, ответ на которые контролируется генами *Ir*, дал очень близкие результаты. Например, при ответе гомозиготных мышей, который контролируется геном *Ir*, локализованным в субобласти *I-A*, обнаруживаются активированные Т-клетки и Т-клеточные клоны с двойной специфичностью к антигену и молекулам *I-A* того же животного. Однако активированные Т-клетки и Т-клеточные клоны, которые сочетанно распознают антиген и кодируемый в субобласти *I-E* рестриктирующий элемент, не обнаружены. Таким образом, в популяции активированных Т-клеток выявляются Т-клетки с двойной специфичностью к антигену и рестриктирующему элементу, который является продуктом области, содержащей отвечающий аллель локуса *Ir*. Не удается обнаружить Т-клетки с двойной специфичностью к антигену и рестриктирующим элементам, представленным продуктами областей, не несущих аллельных форм генов *Ir*, контролирующих ответ на этот антиген.

Можно проделать такие же эксперименты с использованием Т-клеток гибридов F_1 , полученных при скрещивании отвечающей (R, responder) и неответающей (NR, non-responder) родительских линий. Активированные Т-клетки и Т-клеточные клоны таких животных F_1 ($R \times NR$) сочетанно распознают анти-

Таблица 16.3. АПК животных R, но не NR презентируют антиген Т-клеткам гибридов F_1 ($R \times NR$)¹⁾ (по [25])

Т-клетки	Антиген	Отвечающая линия (R)	Способность АПК презентировать антиген		
			F_1 (2×13)	2	13
F_1 (2×13)	Овальбумин	2, 13	+	+	+
F_1 (2×13)	ДФ-GL	2	+	+	—
F_1 (2×13)	GT	13	+	—	+

1) Т-клетки были получены от животных F_1 (2×13) первично иммунизированных овальбумином, ДФ-GL и GT. АПК были получены от животных линии 2, 13 и F_1 (2×13). Ответ определяли по стимуляции включения ^3H -тимидина. Знаком «+» обозначен ответ, знаком «—» — отсутствие ответа.

ген и рестриктурирующий элемент *R*-гаплотипа. Т-клетки, распознающие антиген и рестриктурирующий элемент *NR*-гаплотипа, не выявляются [25, 26] (табл. 16.3).

Эти результаты свидетельствуют о том, что контролируемый генами *Ir* дефект ответа связан с отсутствием «пары», состоящей из антигена и рестриктурирующего элемента *NR*-гаплотипа, или с отсутствием распознавания такой пары Т-клетками. Механизм, который может приводить к такой невосприимчивости, рассматривается ниже.

16.1.5.3. Ответ цитотоксических Т-лимфоцитов контролируется генами *Ir*

Как изложено в предыдущем разделе, гены *Ir* были открыты при анализе тимусзависимого антительного ответа, гиперчувствительности замедленного типа и пролиферативного ответа *in vitro* на белковые антигены и синтетические полипептиды. Участвующие в таком ответе Т-клетки сочетанно распознают антиген и детерминанты (*гистотопы*) рестриктурирующих элементов, кодируемых в области *I*. Гены *Ir*, которые регулируют этот ответ, также картируются в этой области.

Другая группа генов *Ir* главного комплекса гистосовместимости была выявлена недавно. Эти гены контролируют способность Т-клеток лизировать клетки-мишени, в частности инфицированные вирусом клетки-мишени. Ширер и др. [27], а также Догерти и Цинкернагель [28] изящными опытами продемонстрировали, что цитотоксические Т-клетки, специфичные к гаптенному производному или вирусу, функционируют только в том случае, если клетка-мишень экспрессирует антиген, к которому Т-клетка «специфична», и если клетка-мишень несет ту же аллельную форму генов областей *H-2K* и (или) *H-2D*, что донор цитотоксических Т-клеток. Вскоре было показано, что цитотоксические Т-клетки сочетанно распознают антиген и продукт гена областей *H-2K* и (или) *H-2D*. В самом деле, как детально обсуждалось в гл. 15, концепция сочетанного распознавания первоначально была разработана на основе исследований цитотоксических Т-лимфоцитов, а затем была принята исследователями Т-клеточного ответа, рестриктурированного по области *I*. Рестриктурирующими элементами, которые распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами, представляют собой молекулы МНС класса *I*, кодируемые в областях *MHC K* и *D*.

Детальное исследование МНС-рестрикции цитотоксических Т-лимфоцитов показало, что Т-клетки со специфичностью к некоторым вирусам в сочетании с определенными рестриктурирующими элементами встречаются редко, тогда как тот же вирус распознаётся Т-клетками в сочетании с другими рестриктурирующими элементами [29—33]. Именно вирус-специфический МНС-рестриктурированный ответ цитотоксических Т-клеток контролируется генами *Ir*. Эти гены *Ir* картируются в тех областях генома, которые кодируют рестриктурирующие элементы, распознаваемые цитотоксическими Т-лимфоцитами (т. е. в областях *K* и *D*). В табл. 16.4 приведены некоторые системы вирус-специфического ответа, контролируемые генами *Ir*, и аллельные формы областей *K* и (или) *D*, в которых эти гены обнаруживаются.

Согласно современному представлению, гены *Ir*, кодируемые в *K*- и *D*-областях *MHC*, в принципе действуют так же, как и гены *Ir*, кодируемые в области *I*. В частности, отсутствие у данного индивида функционально активных вирус-специфических Т-лимфоцитов можно рассматривать как дефект созревания популяции активированных Т-клеток, способных сочетанно распознавать

Таблица 16.4. Некоторые гены *Ir*, картирующиеся в областях *H-2K* или *H-2D*, контролируют цитотоксический ответ на вирусные антигены (по [29—33])

Вирус	Картирование «неотвечающего» (NR) рестриктивного элемента
Вирус гриппа А	K^b
Вирус Сендай	D^h
Вирус везикулярного стоматита	K^h, D^h
Альфа-вирусы (например, вирус леса Семлики)	$D^d, b, s, q, r; K^d, b, s, q$

эпитопы вирусного антигена и гистотопы кодируемых в областях *K* и *D* рестриктивных элементов неотвечающего гаплотипа *MHC*.

Следует также отметить, что для ответа цитотоксических Т-лимфоцитов часто необходима «помощь» индукторных Т-клеток. Следовательно, могут встретиться случаи, когда дефект ответа цитотоксических Т-лимфоцитов связан с отсутствием у данного индивида генов *Ir*, определяющих хелперный ответ на вирусные антигены. В принципе такие гены *Ir* должны быть локализованы в области *I* и подобны генам *Ir*, описанным в предыдущем разделе этой главы. Такую разновидность ассоциированного с областью *I* контроля генами *Ir* хелперных влияний Т-индукторов на ответ цитотоксических Т-лимфоцитов следует отличать от того контроля генами *Ir*, который связан с отсутствием («запретом») на клетках-мишенях определенных сочетаний антигена и молекул *MHC* класса *I*, распознаваемых цитотоксическими Т-клетками, или с отсутствием Т-клеток, специфичных к этим сочетаниям.

16.2. Природа продукта гена *Ir*

Из первоначального наблюдения, что гены *Ir* и гены, кодирующие молекулы *MHC* класса *II*, обнаружены в одних и тех же областях *MHC*, с высокой вероятностью следует, что продуктами генов *Ir* являются молекулы *MHC* класса *II*. В настоящее время несколько групп данных убедительно подтверждают эту гипотезу.

16.2.1. Молекулы класса *II* несут гистотопы, распознаваемые *MHC*-рестриктивными Т-лимфоцитами

В предыдущих разделах этой главы упоминалось, что гистотопы, распознаваемые Т-клетками в сочетании с эпитопами антигена, обнаруживаются на молекулах *MHC* класса *II*. Однако экспериментально это не было доказано. Эти результаты в деталях приведены в гл. 15 и вкратце суммированы здесь. Данные, на основании которых был сделан этот вывод, заключаются в следующем:

1. Аллоантисыворотки и моноклональные антитела, специфичные к антигенным детерминантам молекул класса *II*, могут отменять ответ Т-клеток на антиген, презентированный на поверхности АПК [34, 35]. Такое подавление ответа происходит лишь в том случае, если Т-клетки специфичны к гистотопу аллельного продукта той же области *MHC*, которая кодирует молекулу класса *II*, несущую распознаваемые антителами антигенные детерминанты. Такой ре-

зультат согласуется с представлением об отмене Т-клеточного ответа в результате связывания и экранирования антителами гистотопа, распознаваемого Т-клеткой в сочетании с антигеном, и свидетельствует о том, что этот гистотоп экспрессируется молекулой класса II.

2. Молекулы класса II состоят из α - и β -цепей. Эти цепи кодируются независимыми генами. Молекулы I-E состоят из продуктов генов E_α и E_β . Ген E_α локализуется в субобласти I-E и характеризуется крайне малым полиморфизмом [36]. Однако у некоторых линий ген E_α , по-видимому, не экспрессирован [23]. Ген E_β в действительности локализуется в субобласти I-A [23, 24]. Таким образом, молекулы I-E класса II, экспрессированные у данной мыши, определяются а) аллельным вариантом (вариантами) гена (генов) E_β субобласти I-A и б) наличием активного гена E_α в субобласти I-E. В связи с этим экспрессия молекул I-E класса II зависит как от генов I-A, так и от генов I-E. Аналогично, ассоциированные с генами I-E рестриктирующие элементы, презентированные на АПК данной мыши, зависят от составляющих аллельных вариантов генов I-A и I-E. Данные о том, что молекулы I-E класса II и ассоциированные рестриктирующие элементы I-E представлены структурами, которые кодируются в областях I-A и I-E, наиболее просто объясняются, если одна и та же молекула является рестриктирующим элементом и молекулой класса II.

3. Наиболее веский аргумент, свидетельствующий об идентичности молекул класса II и рестриктирующих элементов, был получен при изучении антиген-презентирующей функции клеток мышей, несущих мутацию гена класса II. Мыши линии B6.C-H-2^{bm12} несут мутацию, ведущую к образованию A_β -цепи, отличной от A_β -цепи дикого типа мышей C57BL/6 [37]. Эта мутация, по-видимому, приводит к очень небольшим изменениям A_β -цепи¹⁾. АПК мутантных мышей не способны презентировать некоторые антигены специфическим Т-клеточным линиям мышей C57BL/6, которые в норме отвечают на эти антигены в присутствии АПК мышей C57BL/6 [38]. Таким образом, мутация, затрагивающая структуру молекулы класса II, изменяет специфичность сочетанного распознавания гистотопов АПК мутанта. Этот факт убедительно свидетельствует о том, что молекулы класса II несут детерминанты, распознаваемые Т-лимфоцитами. Точно такие же данные исследований клеток, несущих мутацию генов класса I, указывают, что молекулы класса I являются рестриктирующими элементами при ответе, рестриктированном по H-2K и H-2D [39].

16.2.2. Молекулы класса II рестриктируют иммунный ответ, контролируемый генами *Ir*

Три группы данных, приведенные выше, указывают, что Т-клетки сочетанно распознают эпитопы «обычных» антигенов и гистотопы молекул МНС класса II. Поскольку, как нам известно, при зависимом от генов *Ir* ответе Т-клетки узнают антигены в сочетании с продуктами генов области I, можно ду-

¹⁾ Мутация определяет замену трех аминокислотных остатков β -цепи молекулы I-A^b (изолейцин⁶⁷ → фенилаланин, аргинин⁷⁰ → глицин, треонин⁷¹ → лизин), произошедшую в результате конверсии короткого участка ДНК гена I-E β в ген I-A β (Lafuse et al. Fed. Proc., 1985, 44, 557, Mengle-Gaw et al., J. Exp. Med., 1984, 160, 1184—1194). При этом на клетках мышей B6.C-H-2^{bm12} исчезает одна из серологических специфичностей молекул I-A дикого типа (Ia.8) (W. P. Lafuse et al., Transpl. Proc., 1981, 13, 1846—1849) и появляется новая серологическая специфичность Ia.51 (W. P. Lafuse et al., Fed. Proc., 1985, 44, 557). В ответ на детерминанты молекул I-A мутантной линии развивается реакция смешанной культуры лимфоцитов родительской линии мышей C57BL/6 против клеток-стимуляторов B6.C-H-2^{bm12} (L. Mengle-Gaw, H. McDevitt Ann. Rev. Immunol., 1985, 3, 367—396). — Прим. перев.

мать, что рестриктирующими элементами при ответе, контролируемом генами *Ir*, являются молекулы класса II. Этот вывод, по-видимому, верен. В самом деле, в его поддержку можно привести те же три группы доказательств.

1. Аллоантисыворотки и моноклональные антитела, специфичные к молекулам класса II, блокируют *in vitro* ответ Т-лимфоцитов, зависимый от генов *Ir* [34, 35]. Вероятно, самым ранним экспериментальным указанием на важную роль продуктов генов области *I* в Т-клеточном распознавании антигена были данные об «аллель-специфической» отмене ответа Т-клеток в присутствии антисывороток к молекулам МНС класса II (табл. 16.5). Этот эксперимент был выполнен с использованием примированных Т-клеток морских свинок F_1 (2×13), а затем много раз воспроизведен при использовании других систем. Морские

Таблица 16.5. Торможение ответа, контролируемого *Ir*-генами, аллоантисывороткой к молекулам класса II ¹⁾ (по [34])

Т-клетки	Антиген	Отвечающая линия	Торможение ответа		
			Нормальная сыворотка F_1	Антисыворотка против линии 2	Антисыворотка против линии 13
F_1 (2×13)	ДНФ-GL	2	—	+	—
F_1 (2×13)	GT	13	—	—	+

¹⁾ Т-клетки и АПК были получены от животных F_1 (2×13), которых иммунизировали ДНФ-GL или GT. Антисыворотку к молекулам МНС класса II морских свинок линии 2 или 13 добавляли в культуры вместе с антигеном. Торможение ответа в сравнении с ответом в присутствии нормальной сыворотки обозначается знаком «+», отсутствие торможения — знаком «—».

свинки F_1 (2×13) несут гены *Ir*, определяющие ответ на ДНФ-модифицированный GL (ДНФ-GL) и GT. Ген *Ir*, контролирующий ответ на ДНФ-GL, ассоциирован с МНС морских свинок линии 2, а ген *Ir*, контролирующий ответ на GT, ассоциирован с МНС линии 13. При культивировании Т-клеток животных F_1 , которых иммунизировали этими двумя антигенами, в присутствии АПК морских свинок F_1 наблюдался пролиферативный ответ как на ДНФ-GL, так и на GT. Ответ на ДНФ-GL подавлялся в присутствии аллоантисыворотки, специфичной к продуктам генов области *I* линии 2, тогда как антисыворотка к продуктам генов области *I* линии 13 не влияла на этот ответ. В отличие от этого антисыворотка к продуктам генов области *I* линии 13 подавляла ответ на GT, тогда как антисыворотка к продуктам генов области *I* линии 2 в этом случае не обладала ингибирующим действием. Такой результат указывает, что Т-клетки морских свинок F_1 при ответе на ДНФ-GL сочетанно распознают рестриктирующие элементы линии 2 на поверхности АПК животных F_1 . Таким образом, антисыворотка к этим рестриктирующим элементам полностью подавляет ответ, тогда как антисыворотка к рестриктирующим элементам линии 13 не влияет на ответ на ДНФ-GL в полном соответствии с отсутствием ответа на ДНФ-GL, ассоциированным с рестриктирующими элементами (МНС) линии 13. С этими данными полностью согласуются результаты, полученные при изучении торможения ответа на GT, которые свидетельствуют о сочетанном распознавании Т-клетками только рестриктирующих элементов линии 13 при ответе на этот антиген. Используемые в этих экспериментах аллоантисыворотки преимущественно специфичны к молекулам МНС класса II, но, поскольку это антисыворотки, можно предположить, что подавляющим действием обладают антитела к

другим продуктам области *I*. Окончательное доказательство специфического ингибирующего действия антител к молекулам МНС класса II было получено в недавних исследованиях, в которых был обнаружен точно такой же характер торможения *I*_r-зависимого ответа Т-клеток животных F₁ моноклональными антителами к молекулам МНС класса II.

2. Вторая группа доказательств участия молекул МНС класса II в качестве рестриктирующих элементов в иммунном ответе, контролируемом генами *I*_r, связана с исследованиями F₁-специфических рестриктирующих элементов и молекул МНС класса II. Наиболее убедительные из этих экспериментов были выполнены при изучении Т-клеточного ответа на полимер трех аминокислот: L-глутаминовой кислоты, L-лизина и L-фенилаланина (GLP) (табл. 16.6).

Таблица 16.6. АПК, экспрессирующие молекулы E^bE_α класса II, несут рестриктирующий элемент, который Т-клетки мышей В10.А (5R) распознают в сочетании с GLP (по [21])

Источник АПК	Молекулы I-E класса II		Способность презентировать GLP Т-клеточным линиям мышей В10.А (5R)
	E ^b E _α	Другие	
В10.А (5R)	E ^b E _α ^k		+
В10.А	—	E ^k E _α ^k	—
В10.Д2	—	E ^d E _α ^d	—
В10	—	(нет активного гена E _α)	—
В10.RIII	—	E ^r E _α ^r	—
В10.Q	—	(нет активного гена E _α)	—
F ₁ (В10 × В10.А)	E ^b E _α ^k	E ^k E _α ^k	+
F ₁ (В10 × В10.Д2)	E ^b E _α ^d	E ^d E _α ^d	+
F ₁ (В10 × В10.RIII)	E ^b E _α ^r	E ^r E _α ^r	+
F ₁ (В10 × В10.Q)	—	(нет активного гена E _α)	—

Этот ответ контролируется генами *I*_r, которые картируются в областях МНС *I*-А и *I*-Е [7]. Т-клетки мышей В10.А (5R) (*I*-А^b, *I*-Е^k), специфичные к GLP, распознают рестриктирующий элемент, который определяется генами областей *I*-А^b и *I*-Е^{k,d,r}. Формирование этого рестриктирующего элемента в результате комплементации генов четко коррелирует с образованием молекулы МНС класса II полипептидной цепью E^b, кодируемой геном E^b области *I*-А^b, и полипептидной цепью E_α [21]. Полипептид E_α кодируется геном области *I*-Е. Как уже отмечалось, только некоторые линии мышей экспрессируют активный ген E_α; структура цепи E_α очень близка у всех линий мышей, экспрессирующих этот полипептид. Это линии мышей, характеризующиеся аллелями *k*, *d*, *r* локуса *I*-Е. Таким образом, существует четкая корреляция двух последствий комплементации генов: формирования рестриктирующего элемента, участвующего в презентации GLP активированным Т-клетками, и формирования уникальной молекулы МНС класса II. Как и предполагалось, моноклональные ан-

титела к этой молекуле МНС класса II подавляют ответ Т-клеток на GLP в ассоциации с рестриктурирующим элементом $E_B^b E_\alpha^k$ или d .

3. АПК мышей мутантной линии B6.C-H-2^{bm12} утрачивают способность презентировать бычий инсулин иммунным к инсулину Т-клеткам и Т-клеточным линиям мышей C57BL/6 [38]. Ответ на бычий инсулин контролируется геном *Ir*, который кодируется в области *I-A*. Таким образом, мутационное изменение молекулы класса II подавляет способность этой структуры служить рестриктурирующим элементом как при зависимом от генов *Ir*, так и при «обычном» (независимом от генов *Ir*) иммунном ответе.

16.2.3. Молекулы МНС класса II являются продуктами генов *Ir*

Данные о сочетанном Т-клеточном распознавании молекул МНС класса II при зависимом от *Ir* генов и «обычном» иммунном ответе, а также данные об отсутствии у мышей F_1 ($R \times NR$) зрелых Т-клеток, специфичных к антигену в сочетании с молекулами МНС класса II неответающей линии (NR), убедительно свидетельствуют, что продуктами генов *Ir* являются молекулы класса II. Однако, поскольку *Ir*-контроль исходно был определен как способность животного отвечать или не отвечать на данный антиген, для окончательного доказательства идентичности молекул класса II и продуктов генов *Ir* необходимо показать, что молекулы класса II определяют способность животных давать первичный, контролируемый *Ir* генами иммунный ответ на тимусзависимый антиген.

Для подтверждения этого положения мы вновь обратимся к экспериментам по изучению комплементации генов *I-A* и *I-E* при образовании молекул I-E класса II, а также к исследованиям мышей, несущих мутантные гены гистосовместимости класса II. Существенный для проводимого анализа аспект образования молекул I-E продуктами гена E_B субобласти *I-A* и гена E_α субобласти

Таблица 16.7. Иммунный ответ на GLP контролируется генами *I-A* и *I-E* (по [7])

Линия	Аллели МНС					Отвечаемость на GLP	Гены <i>Ir</i> GLP	
	<i>K</i>	<i>I-A</i>	<i>I-E</i>	<i>S</i>	<i>D</i>			
C57BL/10	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	—	—	+
B10.A	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	—	—	+
F_1 (B10 $\times$ B10.A)	<i>b/k</i>	<i>b/k</i>	<i>b/k</i>	<i>b/d</i>	<i>b/d</i>	+	—/+	—/+
B10.A (5R)	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>/k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	+	+	+
B10.A (4R)	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>/b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	—	—	—

I-E заключается в том, что существуют зависимые от генов *Ir* системы иммунного ответа, в которых для ответа необходимо наличие «отвечающего» аллеля как в области *I-A*, так и в области *I-E*. Наиболее исследованным случаем такого контроля является ответ на GLP [7]. Мыши C57BL/10 и B10.A не дают ответа на GLP. Однако их гибриды F_1 отвечают на GLP, что указывает на участие МНС обеих линий в формировании гена *Ir*, определяющего иммунореактивность на этот антиген (табл. 16.7). Эти два гена первоначально были названы *Ir-GLP_α* и *Ir-GLP_β* [ген GLP в англоязычной литературе обозначается также GLФ.— Ред.]. При картировании было показано, что у мышей B10.A (5R)

имеются как $Ir\text{-}GLP_\alpha$, так и $Ir\text{-}GLP_\beta$, а у мышей В10.А (4R) отсутствуют оба этих гена. Этот результат свидетельствует о том, что ген, который несет родительская линия В10.А (ген $Ir\text{-}GLP_\alpha$), картируется справа от субобласти $I\text{-}A$; более полное картирование показало, что этот ген локализуется в субобласти $I\text{-}E$. Ген Ir , имеющийся у родительской линии В10 ($Ir\text{-}GLP_\beta$), был картирован в областях $I\text{-}A$ и K ; в этом случае более тщательное картирование показало, что ген $Ir\text{-}CLP_\beta$ локализован в субобласти $I\text{-}A$. Затем было установлено, что гибриды F_1 мышей линии С57BL/10 (т. е. $Ir\text{-}GLP_\alpha^- \beta^+$) и мышей любой другой линии, которые несут функциональный ген E_α и экспрессируют цепь E_α , отвечают на GLP. Это строго коррелирует с формированием рестриктирующего элемента, необходимого для презентации GLP, а также с образованием молекул класса II, состоящих из цепи E_β и цепи E_α . Таким образом, жесткая согласованность образования данной молекулы класса II и экспрессии отвечающего фенотипа при ответе на GLP ясно указывает, что молекула класса II — продукт гена Ir .

Вероятно, самое убедительное доказательство того, что молекулы класса II являются продуктами генов Ir , следует из сравнения Ir -фенотипа мышей линии С57BL/6 и мутантной линии В6.С-Н-2^{bm12}, полученной на основе мышей С57BL/6. Мутантные мыши не отвечают на такой антиген, как бычий инсулин, ответ на который у мышей С57BL/6 определяется геном Ir субобласти $I\text{-}A$ [38]. Кроме этого, мутантные мыши характеризуются иммунореактивностью на poly-GT (L-глутаминовая кислота⁶⁰, L-тирозин⁴⁰), на который не отвечают мыши С57BL/6 [40]. Поскольку мутация, по-видимому, сводится к небольшому структурному изменению A_β -цепи, эти данные служат в высшей степени обоснованным доказательством идентичности продукта гена Ir и молекулы класса II. Окончательное подтверждение этой идентичности следует ожидать из экспериментов по переносу генов, когда можно будет доказать, что введение клонированных генов молекул МНС класса II в столбовую клетку или эмбрион приводит к переносу Ir -фенотипа, ассоциированного с молекулами МНС класса II.

Хотя экспериментальные данные здесь не приводятся, доказательства идентичности молекул МНС класса I и продуктов генов Ir , картирующихся в областях K и D , столь же убедительны.

16.3. Механизмы действия генов Ir и их продуктов

16.3.1. Типы клеток, в которых экспрессируются гены Ir

В ходе исследования генов Ir и механизмов действия их продуктов центральное место занимал следующий вопрос: в каких клетках проявляется функция генов Ir ? В свете данных первоначальных работ о том, что все системы иммунного ответа, контролируемые генами Ir , зависят от активации Т-клеток, было вполне оправданно предположение о действии генов Ir на уровне Т-клеток. Тот факт, что практически все Т-лимфоциты взаимодействуют с другими клетками в ходе Т-клеточного ответа, лежит в основе противоположной гипотезы об экспрессии функции генов Ir на уровне клеток, взаимодействующих с Т-лимфоцитами. Эта последняя гипотеза в настоящее время признана верной. Из данных об идентичности молекул МНС класса II и продуктов генов Ir следует логичный вывод, что исследовать функцию генов Ir следует только у клеток, экспрессирующих молекулы МНС класса II. Как правило, покоящиеся МНС-рестриктированные антиген-реактивные Т-клетки не экспрессируют молекулы МНС класса II. В отличие от них антиген-презентирующие клетки (например,

макрофаги, дендритные клетки, клетки Лангерганса) и В-лимфоциты экспрессируют эти молекулы. Таким образом, можно было предположить, что гены *Ir* функционируют в АПК и В-лимфоцитах.

Мы уже описали один эксперимент, который свидетельствует в пользу нашего предположения о функционировании генов *Ir* в АПК. Активированные Т-клетки и длительно культивируемые Т-клеточные линии гибридов $F_1 (R \times NR)$ можно стимулировать антигеном в присутствии АПК отвечающей родительской линии (R); антиген и АПК неответающей родительской линии (NR) не вызывают ответа (табл. 16.3). По нашему мнению, эти результаты означают, что отвечающие Т-клетки способны распознавать пару детерминант, состоящую из эпитопа антигена и гистотопа сингенной молекулы класса II отвечающего (R) гаплотипа; пара, состоящая из эпитопа антигена и гистотопа молекулы МНС неответающего (NR) гаплотипа, либо не распознается, либо вообще не образуется. Другими словами, этот результат заключается в том, что АПК от родительской линии R (в отличие от NR) могут стимулировать *Ir*-ген-зависимый ответ активированных Т-клеток животных $F_1 (R \times NR)$. Таким образом, АПК животных линий NR не обладают функциональной активностью, которая контролируется генами *Ir*.

Сходные эксперименты также свидетельствуют о функционировании генов *Ir* в В-лимфоцитах [41]. По этому вопросу существовали значительные разногласия, так как в то время отсутствовали данные о существовании по меньшей мере двух принципиально разных форм взаимодействия Т- и В-лимфоцитов при антительном ответе. Теперь уже очевидно, что в некоторых случаях антительного ответа, опосредованного, в частности, субпопуляцией В-лимфоцитов, несущих дифференцировочный антиген Lyb5 (В-лимфоциты Lyb5⁺), кооперативное взаимодействие В-лимфоцитов с Т-клетками заключается в утилизации растворимых неспецифических Т-клеточных факторов [42]. При таких взаимодействиях Т-клетки могут не распознавать антиген и молекулы МНС класса II на поверхности В-лимфоцитов. Тогда Т-клетки животных $F_1 (R \times NR)$ будут взаимодействовать с В-лимфоцитами мышей линий R и NR при факторзависимом антительном ответе, который контролируется генами *Ir*. Однако для активации Т-клеток, продуцирующих факторы, необходимо МНС-рестриktированное взаимодействие этих Т-лимфоцитов с АПК. В этой системе функционируют АПК только отвечающего (R) гаплотипа.

С другой стороны, антительный ответ В-лимфоцитов Lyb5⁻ на тимусзависимые антигены зависит от МНС-рестриktированных взаимодействий Т- и В-клеток. При таких взаимодействиях Т-клетки иммунных животных $F_1 (R \times NR)$ стимулируют образование антител В-лимфоцитами линии R; В-клетки линии NR не образуют антител даже в присутствии АПК животных линий R. Таким образом, для этого типа клеточных взаимодействий существуют, по-видимому, веские доказательства экспрессии функции генов *Ir* на уровне В-лимфоцитов.

16.3.2. Является ли иммунореактивность, контролируемая генами *Ir*, врожденной или приобретенной?

Эксперименты, описанные в предыдущем разделе, основаны на изучении взаимодействия активированных Т-клеток мышей $F_1 (R \times NR)$ с АПК или В-лимфоцитами родительских линий R и NR. Поскольку установлено, что Т-лимфоциты взаимодействуют с клетками только отвечающей линии, был сделан вывод об экспрессии генов *Ir* именно в этих клетках. Сходные эксперименты по изучению экспрессии генов *Ir* в Т-клетках выполнить не просто, так как в большинстве описанных к настоящему времени систем анализа используются

иммунные Т-клетки. Чтобы определить, отсутствует ли у Т-клеток в принципе способность отвечать на данный антиген или, что по нашему мнению более вероятно, Т-клетки не могут отвечать на сочетание антигена и молекул МНС класса II неотвечающего гаплотипа (т. е. на антиген, презентируемый на АПК неотвечающей линии), следует изучить способность Т-клеток линий R и NR давать первичный ответ на антиген в присутствии АПК как линий R, так и линий NR.

16.3.2.1. Использование радиационных костномозговых химер

Наиболее четкое доказательство потенциальной иммунореактивности Т-клеток животных линий NR было получено при исследованиях радиационных костномозговых химер. Такие мыши широко использовались для выяснения вопроса, является ли признак МНС-рестрикции Т-клеток врожденным или приобретенным. Детальный анализ этого подхода можно найти в гл. 15. В этих экспериментах клетки костного мозга линии X, из которых тщательно удаляли зрелые Т-клетки, переносили летально облученным реципиентам $F_1 (X \times Y)$, причем линии X и Y различались по МНС. Такие химеры обозначаются $X \rightarrow F_1 (X \times Y)$. Костномозговые клетки, содержащие клетки-предшественники гемопоэза, в облученном реципиенте дают начало лимфоидным клеткам, включая Т-клетки и макрофаги. Т-клетки линии X при созревании в животном $F_1 (X \times Y)$ индуцируют толерантность под влиянием среды дифференцировки гибридов F_1 . Если таких животных иммунизировать данным антигеном, то индуцированные иммунные Т-клетки будут «ограниченно» распознавать антиген в сочетании с рестриктивными элементами линии X. Это и неудивительно, поскольку все АПК химер $X \rightarrow F_1 (X \times Y)$ характеризуются гаплотипом МНС линии X. В таком случае происходит активация только Т-лимфоцитов, специфичных к антигену в ассоциации с рестриктивными элементами гаплотипа X.

Однако можно перенести Т-клетки неиммунных химер $X \rightarrow F_1 (X \times Y)$ вместе с источником АПК $F_1 (X \times Y)$ свежесоблюденным реципиентам $F_1 (X \times Y)$. Химерные Т-клетки толерантны к антигенам животного $F_1 (X \times Y)$ хотя и несут генотип линии X. При иммунизации в присутствии АПК, экспрессирующих рестриктивные элементы как гаплотипа линии X, так и гаплотипа линии Y, часть таких активированных Т-клеток с гаплотипом линии X распознает антиген в ассоциации с рестриктивными элементами линии X, а другая — с рестриктивными элементами линии Y [43]. Данный результат свидетельствует о том, что способность Т-клеток к сочетанному распознаванию рестриктивных элементов не ограничивается лишь теми рестриктивными элементами (структурами), которые определяются их собственным геномом.

16.3.2.2. Химеры $NR \rightarrow F_1 (R \times NR)$

Подобный экспериментальный подход может быть использован для изучения способности Т-клеток NR-животных отвечать на антиген, презентируемый на АПК отвечающего R-гаплотипа. Типичный эксперимент из этой серии заключается в переносе клеток костного мозга донора линии NR летально облученным реципиентам $F_1 (R \times NR)$ [44, 45]. Иммунизация антигеном, на который не отвечают животные донорской линии, как и предполагалось, не вызывает иммунного ответа у таких химер, $NR \rightarrow F_1 (R \times NR)$, так как АПК этих животных полностью представлены клетками NR-типа, созревающими из стволовых клеток трансплантированного костного мозга. Однако

если перенести Т-клетки химер $NR \rightarrow F_1 (NR \times R)$ второму облученному реципиенту $F_1 (R \times NR)$ вместе с АПК F_1 -происхождения, то при последующей иммунизации этих животных можно индуцировать ответ. Кроме того, в опытах *in vitro* показано, что Т-клетки, созревающие из костного мозга NR-донора, могут активироваться и отвечать на антиген в сочетании с гистотопами молекул МНС класса II отвечающего (R) гаплотипа. Таким образом, Т-клетки линии NR, ставшие в результате созревания в реципиенте $F_1 (R \times NR)$ толерантными к МНС-антигенам линии R, способны отвечать при иммунизации в присутствии АПК животных $F_1 (R \times NR)$. Следовательно, отсутствие ответа на антиген не является генетически детерминированной особенностью Т-клеток животных NR. В соответствующих условиях такие Т-клетки могут участвовать в иммунном ответе, но та структура, на которую они отвечают, представляет собой «пару» (сочетание) антигена и молекул МНС класса II линии R.

16.3.2.3. Химеры $F_1 (R \times NR) \rightarrow NR$

Такого рода эксперименты позволили прийти ко второму важному, хотя, возможно, и противоречивому заключению. Химеры, полученные при переносе костномозговых клеток $F_1 (R \times NR)$ облученным реципиентам R, не способны отвечать на антигены, на которые животные линии NR сами по себе не отвечают [44, 45]. Поскольку у химер представлены АПК $F_1 (R \times NR)$, которые созревают из трансплантированного костного мозга, ареактивность нельзя объяснить отсутствием таких АПК. Более того, введение химерным животным «свежих» АПК $F_1 (R \times NR)$ животных или перенос Т-клеток химер другому облученному реципиенту $F_1 (R \times NR)$ не достаточны для ответа этих Т-клеток. Таким образом, Т-клетки, полученные из костномозговых клеток отвечающих (R) животных, по-видимому, утрачивают способность к ответу в результате созревания в NR-реципиенте. По некоторым данным у химер развивается состояние специфической супрессии, что объясняет отсутствие иммунореактивности [46]. Однако в настоящее время большинство экспериментальных данных свидетельствует в пользу вывода об истинном отсутствии способности к ответу, а не активной супрессии Т-лимфоцитов химер $F_1 (R \times NR) \rightarrow R$.

В совокупности результаты этих двух групп экспериментов с химерами свидетельствуют, по-видимому, о том, что способность Т-клеток к ответу на

Таблица 16.8. Сводные данные экспериментов с радиационными костномозговыми химерами

Донор стволовых клеток	Облученный реципиент костного мозга	Ответ	
		В первом реципиенте	При введении второму реципиенту $F_1 (R \times NR)$ в сочетании с F_1 -АПК
NR	$F_1 (R \times NR)$	NR	R
$F_1 (R \times NR)$	NR	NR	NR
$F_1 (R \times NR)$	Тимэктомированный $F_1 (R \times NR)$ с пересадкой тимуса NR	NR	—
$F_1 (R \times NR)$	Тимэктомированный $F_1 (R \times NR)$ с пересадкой тимуса R	R	—

антиген, презентируемый на АПК линии R, зависит от того, в каком микроокружении созревали Т-клетки, R или NR. Кроме того, при переносе костного мозга гибридов F_1 ($R \times NR$) тимэктомированному облученному реципиенту F_1 ($R \times NR$) которому был пересажен трансплантат тимуса линии NR, получают химерные животные, не способные отвечать на антиген, презентируемый на АПК линии R. Такие же химеры, но только с трансплантатом тимуса линии R обладают способностью к ответу [47]. Таким образом, созревание Т-клеток-предшественников в тимусе отвечающей (R) линии, по-видимому, определяет, смогут ли эти клетки отвечать на антиген, презентируемый на АПК линии R. Эти результаты суммированы в табл. 16.8.

16.3.2.4. Значение тимуса как места селекции Т-лимфоцитов

Как известно, в тимусе имеются эпителиальные клетки, несущие молекулы класса II [48], а также макрофаги, экспрессирующие молекулы класса II [46]. Вероятно, эти молекулы имеют важное значение для селекции Т-клеток с сочетанной специфичностью к гистотопам молекул класса II и эта селекция формирует экспрессируемый репертуар Т-лимфоцитов. Скорее всего, в основе такой селекции лежит существование в популяции предшественников Т-лимфоцитов отдельных клеток, способных сочетанно распознавать молекулы МНС мышей практически всех гаплотипов. При селекции в тимусе Т-клеток с сочетанной специфичностью к молекулам класса II, экспрессированным на клетках данного тимуса, по-видимому, отбирается популяция Т-клеток, способных распознавать и отвечать на определенный набор антигенов в ассоциации с гистотопами данных молекул МНС. Антигены, на которые могут отвечать мыши данного гаплотипа МНС, как раз и составляют эту группу антигенов.

16.3.2.5. Первичная иммунизация Т-клеток неотвечающей (NR) линии антигеном в присутствии АПК отвечающей (R) линии

В отличие от использования химер, вероятно, более простой подход к исследованию способности Т-клеток NR-гаплотипа отвечать на антиген в ассоциации с рестриктивными элементами R-гаплотипа заключается в попытках активировать *in vitro* Т-клетки NR-животного в присутствии АПК R-гаплотипа [49]. Исходя из данных, полученных при исследовании химер с трансплантированным тимусом, трудно было представить, что подобные эксперименты окажутся удачными, поскольку популяция Т-клеток животных NR дифференцировалась в NR-тимусе и, следовательно, не должна содержать клеток с сочетанной специфичностью к гистотопам рестриктивных элементов R-гаплотипа. Тем не менее такие эксперименты были выполнены и дали интересные результаты. Эти опыты связаны с удалением аллореактивных Т-клеток, присутствие которых затрудняет интерпретацию результатов. Это определяется тем, что Т-клетки линии NR и АПК линии R обязательно несут разные гаплотипы генов области I. Таким образом, АПК R-гаплотипа способны вызвать ответ (в реакции смешанной культуры) аллореактивных клеток из популяции Т-лимфоцитов животных NR. Один способ удаления аллореактивных Т-клеток заключается в стимуляции Т-лимфоцитов животных NR облученными АПК R-гаплотипа в отсутствие экзоантигена. Это индуцирует синтез ДНК в аллореактивных клетках. Подобные клетки можно инактивировать при добавлении бромдезоксисуридина (БУДР) в культуральную среду с последующим освещением культур. В этих условиях БУДР встраивается в ДНК вместо тимидина. Если клетки

выдерживают на свету, БУДР перекрестно сшивает ДНК, что предотвращает дальнейшее деление клетки. Тогда с Т-лимфоцитами линии NR, оставшимися после удаления аллореактивных клеток, можно провести исследование иммунореактивности на антиген в присутствии АПК R-гаплотипа. В некоторых случаях наблюдался иммунный ответ в такой системе [49], что подтверждает данные, полученные при изучении отвечаемости Т-клеток химер $NR \rightarrow F_1 (R \times NR)$. Таким образом, при определенных условиях Т-клетки животных NR могут сочетанно распознавать антиген и рестриктирующие элементы R-гаплотипа.

16.3.2.6. Роль среды дифференцировки в детерминировании Ig-фенотипа

Схема внутритимусной селекции Т-клеток с данной двойной специфичностью распознавания и одновременное формирование репертуара Т-клеточного распознавания представляют собой изящное описание процесса, в котором определяются Ig-фенотип и МНС-рестрикция. Однако, как упоминалось в предыдущем разделе, были получены данные о существовании в нормальной популяции периферических Т-лимфоцитов NR-гаплотипа клеток, способных отвечать на антиген в ассоциации с молекулами класса II R-гаплотипа [49]. На первый взгляд казалось, что эти результаты не совместимы с концепцией селекции в тимусе Т-лимфоцитов, сочетанно распознающих собственные молекулы МНС. Однако представляется возможным, что рецепторы Т-клеток с установленной специфичностью к данному эпитопу антигена и гистотопу чужеродной молекулы МНС класса II связываются также с другим эпитопом в сочетании с гистотопом собственной молекулы класса II. Если это верно, а примеры подобной перекрестной реактивности описаны [50], то, вероятно, данные о Т-клетках с сочетанной специфичностью к чужеродным молекулам МНС не противоречат теории тимусной селекции. Достаточно просто постулировать, что Т-клетки, способные распознавать чужеродный гистотоп, селекционируются в тимусе, поскольку они могут распознавать также и гистотоп собственных молекул МНС класса II.

16.3.3. Теории Ig-генного контроля

Представляется вполне обоснованным утверждение, что животные, у которых отсутствует «отвечающий» аллель данного гена *Ig*, не дают ответа, контролируемого этим геном *Ig*, поскольку не активируются Т-клетки, специфичные к эпитопам соответствующего антигена и любому гистотопу собственных молекул МНС. Неясно здесь следующее: почему определенное сочетание антигена и молекул МНС класса II не вызывает ответа.

Для объяснения такой ареактивности предложен ряд теорий. Эти теории можно разделить на две большие группы. В теориях первой группы принимается, что отсутствие ответа на данную «пару» (антиген + молекула МНС класса II) связана с дефектом образования этой «пары». Отсюда следует, что отсутствие иммунореактивности определяется на уровне постулируемого взаимодействия антигена (или процессированного антигена) и молекул МНС класса II. «Пара» не образуется или нестабильна в связи со структурной несовместимостью. Как будет показано ниже, данная гипотеза подразумевает определенный вид распознавания антигена молекулами МНС класса II.

Согласно другой точке зрения, «пары» образуются нормально или вообще не требуется физического образования «пар». Эта гипотеза утверждает, что, скорее всего, среди потенциально активируемых клеток нет Т-лимфоцитов, спо-

способных распознавать антиген и данные молекулы МНС класса II. Дефицит таких Т-клеток может быть следствием: а) отсутствия генов, определяющих Т-клеточные рецепторы данной специфичности, б) дефекта их положительной селекции в тимусе, в) их удаления при индукции толерантности или г) их супрессии в ходе развития иммунного ответа.

16.3.3.1. Теории Iг-генного контроля, связанного с отсутствием пар

Эти теории предполагают, что а) антиген (или фрагменты антигена) и молекулы класса II взаимодействуют друг с другом с определенной специфичностью и б) ареактивность может быть обусловлена отсутствием взаимодействия данного антигена и данной молекулы класса II или низкой авидностью такого взаимодействия, в результате чего образования эффективного комплекса не происходит. Согласно этим теориям, на антигене и молекулах класса II имеются участки, определяющие такое взаимное распознавание. Таким образом, можно ожидать, что на антигенном фрагменте, участвующем в процессе двойного узнавания, имеются два различных участка [14]. *Эпитоп*, о котором уже говорилось, является участком, распознаваемым Т-клеточным рецептором; *агрепот* (*agretop* — от *antigen-restriction element interaction site*) представляет собой тот участок антигена, который непосредственно взаимодействует с молекулой класса II. По аналогии предполагается, что молекула класса II также имеет два участка: *гистотоп*, или участок, распознаваемый Т-клеточным рецептором, и *дезетоп* (*desetop* — от *determinant selection site*), представляющий собой участок, благодаря которому осуществляется взаимодействие молекулы класса II с агрепотом антигена. Термин «дезетоп» предложенный для этого участка, отражает тот факт, что молекулы класса II, по-видимому, играют важную роль в селекции антигенных детерминант, стимулирующих Т-клеточный ответ.

Физико-химические данные о физиологически значимом взаимодействии антигена и молекул МНС пока не получены¹⁾. Таким образом, прямых доводов в пользу образования такого комплекса и реального существования агрепотопов и дезетопов нет. Тем не менее большая группа не прямых данных свидетельствует в пользу представлений о взаимодействии антигена и молекул МНС, пусть даже это взаимодействие может происходить только при связывании с самим Т-клеточным рецептором.

16.3.3.2. Данные, подтверждающие гипотезу о специфическом взаимодействии антигена и молекул класса II

Наиболее убедительные свидетельства в пользу концепции образования комплекса между антигеном и рестриктивными элементами получено при исследовании узкой специфичности гомогенных популяций Т-лимфоцитов. Представим себе, что эпитопы и гистотопы распознаются независимыми Т-клеточными рецепторными структурами и для этого не требуется взаимодействие между антигеном и рестриктивным элементом. При этих условиях на спектр перекрестной реактивности клонированной популяции Т-клеток не

¹⁾ В настоящее время получены прямые данные об избирательном взаимодействии некоторых антигенов, например синтетических пептидов и процессированной формы бычьего инсулина, только с молекулами класса II отвечающей, но не ареактивной линии. (Rock K. et al., J. Exptl. Med., 1984, 160, 1864—79; R. Schwartz. Ann. Rev. Immunol., 1985, 3, 237—261). — *Прим. перев.*

должна влиять структура сочетанно распознаваемого рестриктирующего элемента. Само собой разумеется, что в случае отсутствия гистотопа молекулы класса II, определяющего иммунореактивность на данный антиген, ни один из эпитопов антигена не способен стимулировать популяцию Т-лимфоцитов. Если же данный эпитоп может вызвать ответ в присутствии двух альтернативных гистотопов, то, согласно представлениям о независимом распознавании, должно быть одинаковое распределение Т-клеточной перекрестной реактивности среди группы структурно близких антигенов в присутствии каждого из двух гистотопов. В отличие от этого, если взаимодействие между антигеном и рестриктирующим элементом является важной составляющей процесса активации Т-клетки, возможны ситуации, когда изменения в структуре антигена могут «компенсировать» изменения в структуре рестриктирующих элементов. В таких случаях распределение перекрестной Т-клеточной реактивности среди различных антигенов может зависеть от того, какой рестриктирующий элемент был использован для презентации этих антигенов. В настоящее время обнаружены различия в узкой специфичности отдельных клонированных Т-клеточных линий при использовании АПК, несущих разные рестриктирующие элементы. Одним из лучших примеров такого зависящего от АПК изменения узкой специфичности является ответ клонированной Т-клеточной линии, которая была получена от мышей В10.А, иммунных к цитохрому *с* голубя [51] (табл. 16.9). Эта Т-клеточная линия распознает цитохром *с* и голубя и моли в

Таблица 16.9. Распределение перекрестной реактивности Т-клеточного клона мышей В10.А, специфичного к цитохрому *с*, зависит от распознаваемого рестриктирующего элемента (по [51])

Антиген-презентирующие клетки		Концентрация антигена, вызывающая 50%-ный от максимального уровня ответ, мМ	
линия	рестриктирующий элемент	цитохром <i>с</i> голубя	цитохром <i>с</i> моли
В10.А	$E_{\beta}^k E_{\alpha}^k$	0,52	0,031
В10.С (9R)	$E_{\beta}^s E_{\alpha}^k$	0,076	3,5

ассоциации с молекулами I-E класса II мышей В10.А, которые состоят из цепей E_{β}^k и E_{α}^k . При использовании для презентации антигена АПК мышей В10.А сравнимый уровень ответа достигается при более низких концентрациях цитохрома *с* моли по сравнению с цитохромом *с* голубя. Очевидно, этот Т-клеточный клон с большим сродством взаимодействует с цитохромом *с* моли и рестриктирующим элементом I-E^k, чем с цитохромом *с* голубя и рестриктирующим элементом I-E^k. Эта Т-клеточная линия отвечает также на цитохром *с* голубя в присутствии АПК мышей В10.С (9R), у которых имеется молекула I-E^k, состоящая из цепей E_{β}^s и E_{α}^k . Однако при использовании АПК мышей В10.С (9R) для индукции максимального ответа требовались более низкие концентрации цитохрома *с* голубя, чем цитохрома *с* моли, что указывает на большее сродство Т-клеток к цитохрому *с* голубя по сравнению с цитохромом *с* моли в ассоциации с рестриктирующим элементом I-E мышей В10.С (9R).

Эти результаты, а также близкие данные, полученные в других системах [52], свидетельствуют о том, что строение как рестриктирующего элемента,

так и антигена определяет общую специфичность структур, распознаваемых Т-клеткой, и изменения в одной из взаимодействующих молекул могут быть компенсированы изменениями в структуре другой.

Вторая группа данных, подтверждающих представление о физическом взаимодействии рестриктирующего элемента и антигена, связана с тем, что уровень Т-клеточной активации определяется произведением концентраций антигена и рестриктирующего элемента (молекул МНС). Так, если число АПК или плотность молекул класса II возрастает, то концентрация антигена, необходимая для достижения максимального Т-клеточного ответа, уменьшается. Если число АПК или плотность молекул класса II снижается, то для максимального ответа требуется больше антигена. Это наилучшим образом согласуется с представлением о Т-клеточном распознавании продукта взаимодействия антигена и рестриктирующего элемента. Концентрация таких комплексов определяется произведением концентраций двух компонентов реакции (т. е. антигена и рестриктирующего элемента).

Хотя обе приведенные группы данных лучше всего согласуются с представлением о физическом взаимодействии антигена и молекул класса II, возможно, как уже отмечалось, это взаимодействие происходит лишь в составе тримолекулярного комплекса, состоящего из антигена, рестриктирующего элемента и Т-клеточного рецептора.

16.3.3.3. Пары антигена и молекулы класса II могут образовываться, но с этим не связана активность, определяемая генами *I*_r

Выявление, хотя и не прямое, акта взаимодействия с определенной степенью специфичности между антигеном и рестриктирующим элементом еще не говорит о том, что отсутствие ответа, зависящее от гена *I*_r, обусловлено срывами этого взаимодействия. В самом деле, в настоящее время получены данные о том, что в культуре можно индуцировать взаимодействие Т-лимфоцитов животных линии R с антигеном в ассоциации с АПК линии NR [54]. Этот результат указывает на отсутствие каких-либо физических ограничений для взаимодействия антигена и рестриктирующих элементов АПК NR-гаплотипа. Экспериментальный подход, использованный при получении этих данных, включает обязательный этап удаления аллореактивных Т-клеток линии R, отвечающих на АПК NR-гаплотипа, с помощью БУДР и освещения. Поскольку полное удаление аллореактивных клеток трудно достижимо и не определена частота Т-клеток, отвечающих на антиген и АПК NR-гаплотипа, нельзя полностью исключить возможную роль «аллогенных» эффектов, усиливающих слабоиммуногенные сигналы при активации Т-клеток линии R антигеном в ассоциации с АПК NR-гаплотипа. Тем не менее эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что дефект образования иммуногенного комплекса между антигеном и рестриктирующим элементом NR-гаплотипа не объясняет всех случаев отсутствия ответа, контролируемого генами *I*_r. В самом деле, подобный дефект если и может быть причиной ареактивности, то лишь в небольшом числе случаев.

16.3.3.4. «Дыры» в репертуаре Т-клеточного распознавания

Согласно другой большой группе теорий, объясняющих механизмы контроля иммунного ответа генами *I*_r, ареактивность обусловлена отсутствием Т-клеток, способных распознавать данное сочетание «антиген—рестриктирующий

элемент». Эти теории в основном стремятся показать, каким образом гаплотип *MHC* данного индивида вызывает «дыры» в репертуаре Т-клеточного распознавания. Существует три основных типа этих теорий: а) отсутствие ответа на данное сочетание антигена и рестриктирующего элемента связано с отсутствием в геноме генов, которые кодируют рецепторы, распознающие эту пару; б) отсутствие ответа на данную пару антигена и рестриктирующего элемента обусловлено удалением потенциально отвечающих Т-клеток при индукции толерантности к собственным антигенным структурам; в) отсутствие ответа на данную пару антигена и рестриктирующего элемента является результатом доминантной супрессии Т-клеток, специфичных к определенным сочетаниям антигенов и молекул класса II.

**16.3.3.5. Распознавание пар антигена
и рестриктирующего элемента может быть ограничено
разнообразием Т-клеточных рецепторов**

Теории, в которых предполагается реальное отсутствие в геноме генов Т-клеточных рецепторов со специфичностью к определенным парам, в принципе утверждают, что генетическое разнообразие ограничено и даже под воздействием соматических мутаций рецепторы к некоторым парам не образуются. Интерес представляют варианты теории, в которых предполагается, что рецепторные структуры, распознающие эпитопы и гистотопы, кодируются независимо, но могут быть экспрессированы только вместе. Из этих теорий, вероятно, наибольшим влиянием пользовалась предложенная фон Бёмером и др. [55] концепция дефекта селекции Т-клеток определенной специфичности. Эти исследователи постулировали, что гаметные (первичных половых клеток) гены Т-клеточного рецептора кодируют исключительно структуры, способные распознавать только рестриктирующие элементы главного комплекса гистосовместимости. Далее они предположили, что каждая Т-клетка экспрессирует два «рецепторных» гена. Если оба гена кодируют рецепторы, специфичные к собственным рестриктирующим элементам, то можно ожидать, что такие клетки будут обладать высокой аффинностью к собственным продуктам области I и удаляются при запуске механизма толерантности. Таким образом, для селекции мутантов по одному из этих двух локусов должно существовать значительное давление отбора на клетки этого типа. Такие мутанты могут и дальше экспрессировать один из генов, кодирующих рецептор к рестриктирующему элементу своего гаплотипа *MHC*. Это позволит им сочетанно распознавать собственные гистотопы. Мутантный ген, по крайней мере в некоторых случаях, обеспечит этим клеткам способность распознавать эпитопы чужеродного антигена. Очевидно, что структура генов рецептора, специфичного к собственным рестриктирующим элементам, будет определять, какой чужеродный антиген может быть распознан, поскольку постоянно появляющиеся мутации должны, по-видимому, приводить к образованию рецепторов с относительно ограниченным разнообразием специфичности. Хотя из этой теории и следует несколько предсказаний, наиболее важное из них касается структуры Т-клеточного рецептора. В частности, эта теория предсказывает, что гены, кодирующие эпитоп-специфические элементы, происходят из гаметных генов, кодирующих элементы рецептора. Настоящий прогресс в работах по изучению рецепторов Т-лимфоцитов, по-видимому, позволит проверить эту и другие близкие теории в течение следующих нескольких лет.

16.3.3.6. *Отсутствие ответа может быть связано с индукцией толерантности к паре аутологичного антигена и собственного рестриктирующего элемента*

Отсутствие ответа, зависимое от гена *Ir*, также может быть связано с удалением Т-клеточных клонов, способных распознавать данную пару антигена и рестриктирующего элемента, вследствие индукции толерантности к некоторым собственным антигенам. Например, при развитии Т-клеточной толерантности к аутологичному инсулину, ассоциированному с собственным рестриктирующим элементом, клоны Т-клеток такой специфичности удаляются. Поскольку Т-клетки, специфичные к данной паре, могут взаимодействовать также и с другими антигенами в сочетании с тем же рестриктирующим элементом, удаление аутореактивных клонов может влиять на ответ на эти антигены. Если при индукции толерантности к аутологичным антигенам удаляются все клоны, способные распознавать конкретный чужеродный антиген в ассоциации с собственным рестриктирующим элементом, то данный индивид не будет отвечать на данный антиген вследствие МНС-рестриктированной индукции толерантности [56]. Связь иммунореактивности с гаплотипом *МНС* является следствием возможной перекрестной реактивности между аутологичным антигеном в ассоциации с данным собственным рестриктирующим элементом и чужеродным антигеном в ассоциации с тем же рестриктирующим элементом. Перекрестная реактивность рецепторов Т-клеток, специфичных к чужеродному антигену в сочетании с другим рестриктирующим элементом, и Т-клеток, специфичных к аутологичному антигену в сочетании с данным рестриктирующим элементом, не обязательна. Таким образом, особи с другим гаплотипом *МНС* не должны элиминировать Т-клетки, отвечающие на этот чужеродный антиген в ассоциации с их собственными рестриктирующими элементами. Следовательно, такие животные являются отвечающими.

Представления об элиминации клонов при индукции толерантности как о причине зависимой от генов *Ir* ареактивности, полностью согласуются с данными о том, что в некоторых случаях Т-клетки животных *R*, но не $F_1 (R \times NR)$ можно активировать *in vitro* антигеном в присутствии АПК линии *NR* [54, 57]. У отвечающей особи потенциально реактивные клоны не удаляются, но у животных $F_1 (R \times NR)$ присутствие рестриктирующих элементов *NR*-гаплотипа при индукции толерантности к аутоантигенам может приводить к элиминации клонов, специфичных к антигену в сочетании с рестриктирующими элементами *NR*-гаплотипа.

Недавно описан интересный случай, согласующийся с этой теорией [58] (табл. 16.10). Морские свинки линии 2 не отвечают на В-цепь бычьего инсулина. Морские свинки линии 13, которые генетически близки линии 2 и отличаются от нее только по области *I*, способны отвечать на этот антиген. После удаления аллореактивных клонов, специфичных к антигенам линии 2, Т-клетки линии 13 можно иммунизировать *in vitro* В-цепями бычьего инсулина, презентируемыми АПК линии 2. От морских свинок линии 13 были получены длительно культивируемые Т-клеточные линии, специфичные к В-цепи инсулина в ассоциации с АПК линии 2. Такие Т-клетки не только взаимодействуют с В-цепью бычьего инсулина, презентируемой на АПК линии 2, но и с инсулином морских свинок, презентируемым на АПК линии 2. Это свидетельствует о том, что у морских свинок линии 13 основные клоны, способные распознавать В-цепь инсулина в сочетании с АПК линии 2, распознают также В-цепь аутологичного инсулина в сочетании с АПК линии 2. Если репертуар Т-клеточных рецепторов линии 2 подобен репертуару линии 13, что представляется вероятным, то у жи-

Таблица 16.10. Т-клеточная линия морских свинок линии 13 (отвечающие животные) распознает инсулин быка и морских свинок в ассоциации с АПК морских свинок линии 2 (неотвечающие животные)¹⁾ (по [58])

Инсулин-специфическая Т-клеточная линия	АПК		В-цепь инсулина	Ответ
	линия	I-фенотип		
Морских свинок	13	R	Бычий	+
линии 13	13	R	Морских свинок	—
(рестриктированная	2	NR	Бычий	—
по МНС линии 13)	2	NR	Морских свинок	—
Морских свинок	13	R	Бычий	—
линии 13 (рестрикти-	13	R	Морских свинок	—
рования по МНС	2	NR	Бычий	+
линии 2)	2	NR	Морских свинок	+

¹⁾ Инсулин-специфическую Т-клеточную линию получали из Т-клеток морских свинок линии 13, которые активировали *in vitro* бычьим инсулином. «Обычная» Т-клеточная линия распознаёт бычий инсулин в сочетании с рестриктирующими элементами линии 13. Линия, рестриктированная по МНС линии 2, распознает рестриктирующие элементы линии 2, с которыми ассоциирован бычий инсулин или инсулин морских свинок.

вотных линии 2 этот клон должен удаляться при индукции толерантности к аутологичному инсулину. Этот результат демонстрирует, что индукция толерантности может играть важную роль при отсутствии ответа, контролируемого генами *Ir*. Однако чего эти результаты не объясняют, так это отсутствия Т-клеточных клонов, специфичных к В-цепи бычьего инсулина в ассоциации с АПК линии 2, которые не обладают перекрестной реактивностью с аутологичным инсулином в сочетании с АПК линии 2. Это может представлять собой геномное ограничение репертуара Т-клеточных рецепторов. В таком случае «дыры» в репертуаре Т-клеток линии 2, обуславливающие отсутствие у них ответа на В-цепь инсулина, являются следствием сочетанного эффекта ограничений самого репертуара рецепторов и МНС-рестриктированной индукции толерантности к аутоантигенам.

16.3.3.7. Супрессорные Т-клетки могут подавлять ответ на некоторые пары «антиген — рестриктирующий элемент»

В качестве возможной причины отсутствия контролируемого *Ir*-генами ответа в заключение следует рассмотреть избирательную активацию Т-супрессоров, способных подавить ответ Т-лимфоцитов на определенные пары антигена и рестриктирующего элемента. Иммунный ответ на полимер, состоящий из L-глутаминовой кислоты, L-аланина и L-тирозина (GAT), оказался той системой, работая с которой несколько групп исследователей установили влияние Т-супрессоров. При изучении этой системы было сделано предположение, что зависимое от гена *Ir* отсутствие ответа определяется такой супрессией [59]. Основная трудность, связанная с попыткой объяснить, каким образом супрессорные Т-клетки вызывают контролируемое *Ir*-генами отсутствие ответа, заключается в том, что в отношении таких клеток не обнаружено сочетанного распознавания антигена и рестриктирующих элементов. По-видимому, Т-супрессоры непосредственно взаимодействуют с антигеном. При отсутствии способности дискриминировать сочетания антигена с рестриктирующими элементами разных

гаплотипов трудно объяснить, как супрессия может быть специфичной по отношению к клеткам с данным типом сочетанного распознавания молекул МНС. Однако узкая специфичность супрессорных Т-клеток в деталях не изучена, поскольку длительно культивируемые супрессорные линии Т-лимфоцитов получены лишь в отдельных случаях. В настоящее время описаны супрессорные Т-клетки, которые, по-видимому, распознают антиген и рестриктирующие элементы, кодируемые в области *I* [60]. Еще более заманчивым кажется предположение, что такие клетки могут экспрессировать рестриктирующие элементы на мембранах и, таким образом, презентируют хелперным и другим Т-клеткам *Lyf* 1⁺ как антиген, так и рестриктирующие элементы [60]. Следовательно, Т-клетки с сочетанной специфичностью к антигену и данному рестриктирующему элементу могут быть супрессированы, поскольку они распознают и реагируют с парой антигена и рестриктирующего элемента на поверхности супрессорной клетки. В какой степени такой механизм определяет общую феноменологию *Ir*-генного контроля специфического иммунного ответа, остается невыясненным, но детальное исследование роли супрессии как причины отсутствия ответа контролируемого генами *Ir* заслуживает серьезного обсуждения.

Заключение

В этой главе контроль иммунного ответа, осуществляемый генами *Ir*, рассматривается главным образом как частный случай контроля клеточных взаимодействий генами МНС. В самом деле, именно в ходе исследований отдельных случаев ареактивности, контролируемой генами *Ir*, возникли одни из наиболее глубоких представлений о роли молекул класса I и II в клеточных взаимодействиях. Из этой главы читателю должно стать ясно, что исследование *Ir*-генного контроля иммунного ответа поможет найти новые подходы к выяснению природы, специфичности и генетической организации Т-клеточных рецепторов. Изучение *Ir*-генного контроля в этом аспекте ведется в настоящее время с высокой интенсивностью, в частности благодаря разработке серологических, химических и молекулярно-генетических методов для этих исследований.

Наконец, вполне возможно, что контролируемый генами *Ir* иммунный ответ лежит в основе ассоциации определенных патологий человека и животных с гаплотипом главного комплекса гистосовместимости [61]. Более полное понимание механизмов *Ir*-генного контроля может помочь разработке подходов к профилактике и лечению таких нарушений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schwartz R. H. Functional properties of I region gene products and theories of immune response (*Ir*) gene function. In: *Ia Antigens*, Vol. I: Mice, ed. by S. Ferrone and C. S. David, pp. 161—218, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
2. Benacerraf B., Green I., Paul W. E. The immune response of guinea pigs to hapten-polylysine conjugates as an example of the genetic control of the recognition of antigenicity, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 32, 569 (1967).
3. Ellman L., Green I., Martin W. J., Benacerraf B. Linkage between the PLL gene and the locus controlling the major histocompatibility antigen in strain 2 quinea pigs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66, 322 (1970).
4. Blüstein H. G., Green I., Benacerraf B. Specific immune response genes of the guinea pig. II. Relationship between the poly-L-lysine gene and the genes controlling immune responsiveness to copolymers of L-glutamic acid and L-tyrosine in random-bred Hartley guinea pigs, J. Exp. Med., 134, 471 (1971).

5. *McDevitt H. O., Sela M.* Genetic control of the antibody response. II. Further analysis of the specificity of determinant-specific control, and genetic analysis of the response to (H, G)-A — L in CBA and C57 mice, *J. Exp. Med.*, **126**, 969 (1967).
6. *McDevitt H. O., Deak B. D., Shreffler D. C., Klein J., Stimpfling J. H., Snell G. D.* Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus, *J. Exp. Med.*, **135**, 1259 (1972).
7. *Dorf M. E., Benacerraf B.* Complementation of H-2-linked Ir genes in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3671 (1976).
8. *Lieberman R., Paul W. E., Humphrey W., Stimpfling J. H.* H-2 linked immune response (Ir) genes: Independent loci for Ir-IgG and Ir-IgA genes, *J. Exp. Med.*, **136**, 1231 (1972).
9. *Baxevis C. N., Nagy Z. A., Klein J.* A novel type of T-T cell interaction removes the requirement for I-B region in the H-2 complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3809 (1981).
10. *Longo D. L., Paul W. E.* Immune response genes and Ia antigens. The relationships between them and their role in lymphocyte interaction. In: *Histocompatibility Antigens*, ed. by P. Parham and J. L. Strominger, p. 159, Chapman and Hall, London, 1982.
11. *Mitchell G. E., Grumet F. C., McDevitt H. O.* Genetic control of the immune response. The effect of thymectomy on the primary and secondary antibody response of mice to poly-L-(Tyr, Glu)-poly-D-L-Ala-poly-L-Lys, *J. Exp. Med.*, **135**, 126 (1972).
12. *Bottomly K., Maurer P. H.* Antigen-specific helper T cells required for dominant production of an idiotype (ThId) are not under immune response (Ir) gene control, *J. Exp. Med.*, **152**, 1571 (1980).
13. *Paul W. E., Benacerraf B.* Functional specificity of thymus-dependent lymphocytes, *Science*, **195**, 1293 (1977).
14. *Heber-Katz E., Hansburg D., Schwartz R. H.* The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation, *J. Mol. Cell. Immunol.* (in press), 1983.
15. *Waldron J. A., Horn R. G., Rosenthal A. S.* Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocyte in vitro: Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by T-lymphocytes, *J. Immunol.*, **111**, 58 (1973).
16. *Schwartz R. H., Yano A., Paul W. E.* Interaction between antigen-presenting cells and primed T lymphocytes: An assessment of Ir gene expression in the antigen-presenting cell, *Immunol. Rev.*, **40**, 153 (1978).
17. *Steinman R. M., Witmer M. D.* Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte response in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5132 (1978).
18. *Stingl G., Katz S. I., Clement L., Green I., Shevach E. M.* Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhan's cells, *J. Immunol.*, **121**, 2005 (1978).
19. *Glimcher L. H., Kim K. J., Green I., Paul W. E.* Ia antigen bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in an MHC-restricted fashion to antigen-reactive T cells, *J. Exp. Med.*, **155**, 445 (1982).
20. *Chesnut R. W., Grey H. M.* Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells, *J. Immunol.*, **126**, 1075 (1981).
21. *Sredni B., Matis L. A., Lerner E. A., Paul W. E., Schwartz R. H.* Antigen-specific T cell clones restricted to unique F₁ major histocompatibility complex determinants. Inhibition of proliferation with a monoclonal anti-Ia-antibody, *J. Exp. Med.*, **153**, 677 (1981).
22. *Kimoto M., Fathman C. G.* Antigen-reactive T cell clones. I. Transcomplementing hybrid I-A-region gene products function effectively in antigen-presentation, *J. Exp. Med.*, **152**, 759 (1980).
23. *Jones P. P., Murphy D. B., McDevitt H. O.* Two-gene control of the expression of a murine Ia antigen, *J. Exp. Med.*, **148**, 925 (1978).
24. *Uhr J. W., Capra J. D., Vitetta E. S., Cook R. G.* Organization of immune response genes, *Science*, **206**, 292 (1979).
25. *Shevach E. M., Rosenthal A. S.* Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response, *J. Exp. Med.*, **138**, 1213 (1973).
26. *Yano A., Schwartz R. H., Paul W. E.* Antigen-presentation in the murine T lymphocyte proliferative response. II. Ir-GAT-controlled T lymphocyte responses require antigen presenting cells from a high responder donor, *Eur. J. Immunol.*, **8**, 344 (1978).
27. *Shearer G. M., Rehn T. G., Garbarino C. A.* Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, **141**, 1348 (1975).
28. *Doherty P. C., Zinkernagel R. M.* H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Exp. Med.*, **141**, 502 (1975).
29. *Doherty P. C., Biddeson W. E., Bennink J. R., Knowles B. B.* Cytotoxic T-cell responses in mice infected with influenza and vaccinia viruses vary in magnitude with H-2 genotype, *J. Exp. Med.*, **148**, 534 (1978).

30. Zinkernagel R. M., Althage A., Cooper S., Kreeb G., Klein P. A., Sefton B., Flaherty L., Stimpfling J., Shreffler D., Klein J. Ir-genes in H-2 regulate generation of antiviral cytotoxic T cells. Mapping to K or D and dominance of unresponsiveness, *J. Exp. Med.*, **148**, 597 (1978).
31. Kurrie R., Rollinghoff M., Wagner H. H-2-linked murine cytotoxic T cell response specific for Sendai virus-infected T cells, *Eur. J. Immunol.*, **8**, 910 (1978).
32. Mullbacher A., Blanden R. V., Murine cytotoxic T-cell response to alphavirus is associated mainly with H-2D^k, *Immunogenetics*, **7**, 551 (1978).
33. Rosenthal K. L., Zinkernagel R. M. Inability of mice to generate cytotoxic T lymphocytes to vesicular stomatitis virus restricted to H-2K^k or H-2D^k, *J. Immunol.*, **126**, 446 (1981).
34. Shewach E. M., Paul W. E., Green I. Histocompatibility-linked immune response gene function in guinea pigs: Specific inhibition of antigen induced lymphocyte proliferation by allo-antisera, *J. Exp. Med.*, **136**, 1207 (1972).
35. Lerner E. A., Matis L. A., Janeway C. A., Jones P. P., Schwartz R. H., Murphy D. B. Monoclonal antibody against an Ir gene product? *J. Exp. Med.*, **152**, 1085 (1980).
36. Cook R. G., Vitetta E. S., Uhr J. W., Capra J. D. Structural studies of the murine Ia alloantigen. III. Tryptic peptide comparison of allelic products of the I-E/C sub-region, *Mol. Immunol.*, **16**, 29 (1979).
37. McKean D. J., Melvold R. W., David C. S. Tryptic peptide comparison of Ia antigen alpha and beta polypeptides from the I-A mutant B6-C-H-2^{bm12} and parental strain B6, *Immunogenetics*, **14**, 41 (1981).
38. Lin C.-C. S., Rosenthal A. S., Passmore H. C., Hansen T. H. Selective loss of antigen-specific Ir gene function in I-A mutant B6. C-H-2^{bm12} is an antigen-presenting cell defect, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6406 (1981).
39. Ciavarrà R., Forman J. Cell membrane antigens recognized by anti-viral and anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes, *Immunol. Rev.*, **58**, 73 (1981).
40. Lei H. Y., Melvold R. W., Miller S. D., Wattenbaugh C. Gain/loss of poly (Glu⁶⁰Tyr⁵⁰)/poly (Glu⁶⁰Ala⁸⁰Tyr¹⁰) responsiveness in the bm12 mutant strain, *J. Exp. Med.*, **156**, 596 (1982).
41. Katz D. H., Hamaoka T., Dorf M. E., Maurer P. H., Benacerraf B. Cell interaction between histoincompatible T and B lymphocytes. IV. Involvement of immune response (Ir) gene control of lymphocyte interaction controlled by the gene, *J. Exp. Med.*, **138**, 734 (1973).
42. Singer A., Morrissey P. J., Hathcock K. S., Ahmed A., Scher I., Hodes P. J. Role of the major histocompatibility complex in T cell subpopulations. Lyb5⁺ and Lyb5⁻ B cell subpopulation differ in their requirement for major histocompatibility complex-restricted T cell recognition, *J. Exp. Med.*, **154**, 501 (1981).
43. Sprent J. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice in vivo, *Immunol. Rev.*, **42**, 108 (1978).
44. Kappler J. W., Marrack P. The role of H-2 linked genes in helper T-cell function. IV. Importance of T-cell genotype and host environment in I-region and Ir gene expression, *J. Exp. Med.*, **148**, 1510 (1978).
45. Longo D. L., Matis L. A., Schwartz R. H. Insights into immune response gene function from experiments with chimeric animals, *CRC Crit. Rev. Immunol.*, **2**, 83 (1981).
46. Beller D. I., Unanue E. R. Ia antigens and antigen-presenting function of thymic macrophages, *J. Immunol.*, **124**, 1433 (1980).
47. Miller J. F. A. P., Gamble J., Mottram P., Smith F. I. Influence of thymus genotype on acquisition of responsiveness in delayed-type hypersensitivity, *Scand. J. Immunol.*, **9**, 29 (1979).
48. Rouse R. V., Van Ewijk W., Jones P. P., Weissman I. L. Expression of MHC antigens by mouse thymic dendritic cells, *J. Immunol.*, **122**, 2508 (1979).
49. Ishii N., Nagy Z. A., Klein J. Absence of Ir gene control of T cells recognizing foreign antigen in the context of allogeneic MHC molecules, *Nature*, **295**, 531 (1982).
50. Sredni B., Schwartz R. H. Alloreactivity of an antigen-specific T cell clone, *Nature*, **287**, 855 (1980).
51. Matis L. A., Longo D., Hedrick S. M., Hannum C., Margoliash E., Schwartz R. H. Clonal analysis of the major histocompatibility complex restriction and the fine specificity of antigen recognition in the T cell proliferative response to cytochrome c, *J. Immunol.*, **130**, 1527 (1983).
52. Hunig T. R., Bevan M. J., Specificity of T-cell clones illustrates altered self hypothesis, *Nature*, **294**, 460 (1981).
53. Matis L. A., Glimcher L. H., Paul W. E., Schwartz R. H. The magnitude of response of histocompatibility-restricted T cell clone is a function of the product of concentrations of antigen and Ia molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press) (1983).
54. Ishii N., Baxeveis C. N., Nagy Z. A., Klein J. Responder T cells depleted of alloreactive

- cells react to antigen presented on allogeneic macrophages from nonresponder strains, *J. Exp. Med.*, **154**, 978 (1981).
55. *von Boehmer H., Haas W., Jerne N. K.* Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2439 (1978).
56. *Schwartz R. H.* A clonal deletion model for Ir gene control of the immune response, *Scand. J. Immunol.*, **7**, 3 (1978).
57. *Thomas D.* Genetic control of T lymphocyte responses by in vitro sensitization with macrophage-bound antigens, *J. Immunol.*, **121**, 61 (1978).
58. *Dos Reis G. A., Shevach E. M.* Antigen-presenting cells from nonresponder strain 2 guinea pigs are fully competent to present bovine insulin B chain to responder strain 13 T cells. Evidence against a determinant selection model and in favor of a clonal deletion model of immune response gene function, *J. Exp. Med.*, **157**, 1287 (1983).
59. *Pierce C. A., Kapp J. A.* Suppressor T cell activity in responder X nonresponder (C57BL/10 $\times$ DBA/1) F_1 spleen cells responsive to L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰, *J. Exp. Med.*, **148**, 1282 (1978).
60. *Nagy Z. A., Baxevanis C. N., Klein J.* Haplotype-specific suppression of T cell response to lactate dehydrogenase B in (responder $\times$ nonresponder) F_1 mice, *J. Immunol.*, **129**, 2608 (1982).
61. *Moller G.* (ed.) HLA and disease susceptibility, *Immunol. Rev.*, **70**, 5 (1983).

Антигены лимфоцитов

П. Марк Хогарт, Ян Ф.Ц. Мак-Кензи

(P Mark Hogarth, Ian F. C. McKenzie)

Помимо описанных в предыдущих главах антигенов, обнаруживаемых на всех клетках, и у мыши, и у человека имеется большое количество антигенов, встречающихся только у лимфоцитов или проявляющихся преимущественно на лимфоцитах. Исследование этих антигенных систем представляет собой одно из наиболее впечатляющих достижений иммуногенетики за последние десять лет. Как велико значение этой работы, стало особенно очевидным, когда обнаружилось, что некоторые антисыворотки выявляют функциональные субпопуляции лимфоцитов и, следовательно, с их помощью можно отделить друг от друга хелперные супрессорные и киллерные Т-лимфоциты. Антисыворотки к этим антигенам лимфоцитов сыграли важную роль в определении различных типов клеток, взаимодействующих при иммунных ответах. Появилась также возможность использовать эти антисыворотки для избирательной регуляции иммунного ответа у человека; подобные исследования сейчас приводят с использованием моноклональных антисывороток. Эти работы значительно продвинулись вперед, когда были разработаны новые методы. Десять лет назад для описания новой антигенной системы было достаточно простых иммунизаций, адсорбций и генетических экспериментов. Сейчас для того, чтобы четко охарактеризовать антигенную систему, необходимо использовать моноклональные антитела, проводить сложные цитофлюорографические анализы и применять биохимические методы в сочетании с функциональными тестами. В ближайшие несколько лет будут клонированы многие гены, кодирующие антигены, что значительно увеличит наши знания об этих антигенных системах.

В этой главе будут описаны основные принципы, используемые при анализе антисывороток, и приведены данные о многих известных к настоящему времени антигенных системах мыши, человека и других видов. Читателям, не знакомым с этой областью, необходимо иметь в виду несколько важных обстоятельств. Во-первых, антигены лимфоцитов в большинстве случаев служат только маркерами для определения различных функций лимфоцитов. Сами антигены, за редким исключением, не имеют прямого отношения к этим конкретным функциям. Во-вторых, обозначение «L_y» не обязательно означает, что описываемый антиген обнаруживается только на лимфоцитах и не выявляется в других тканях. Это, однако, не мешает использованию таких антисывороток для исследования очищенных популяций лимфоцитов. Наконец, следует иметь в виду, что область иммуногенетики в настоящее время находится в той фазе, когда информация из-за появления новых, более чувствительных методов накапливается очень быстро. И не исключено, что многое из того, что сейчас кажется доказанным фактом и используется на практике, придется в корне пересмотреть в ближайшие несколько лет. Дополнительную информацию об антигенах лимфоцитов можно найти в других главах этого сборника: об антигенах Ia — в гл. 13, об антигенах Qa и Tla — в гл. 14, в также в ряде обзоров [1—3].

17.1. Классификация антигенов мышинных лимфоцитов

В табл. 17.1 приведена основанная на тканевом распределении классификация поверхностных антигенов мышинных лимфоцитов. Перечисленные в таблице антигены подразделены на несколько групп: 1) те, которые обнаруживаются только в тимусе, 2) те, которые обнаруживаются только у Т-клеток,

Таблица 17.1. Классификация антигенов мышинных лимфоцитов

Только тимус	TL ¹⁾ , G ₁ X, Ly-11 ²⁾ , Eq-7
Только Т-клетки	Thy-1, Thy-2, Ly-1 ¹⁾ , Ly-2 ¹⁾ , Ly-3, I-C ¹⁾ , I-J ¹⁾
Только В-клетки	Lyb-2 ¹⁾ , 3 ¹⁾ , 4 ¹⁾ , 5 ¹⁾ , 6 ¹⁾ , 7 ¹⁾ , Ly-17 ¹⁾ , Ly-m20, LyM-1, I-A, I-E, PC-1, PC-2 ¹⁾
Т-клетки и В-клетки	Ly-4, Ly-5, Ly-6, Ly-7 ¹⁾ , Ly-9, Ly-m10, Ly-m11, Ly-11 (Меруло), Ly-12 ¹⁾ , Ly-13, Ly-14, Ly-15 ¹⁾ , Ly-16 Lu-m18, Ly-m19

1) Обнаружены только на лимфоидных клетках.

2) Путаница в номенклатуре Ly-антигенов привела к тому, что были описаны три неродственных антигена Ly-11: Ly-11 [1], Ly-m11 [3] и Ly-11 [23].

3) те, которые обнаруживаются только у В-клеток, и, наконец, 4) те, которые обнаруживаются как у Т-, так и у В-клеток. Из таблицы видно, что антитела против Ly выявляют множество поверхностных антигенов, а если учесть антигены, выявляемые ксеноантисыворотками, то на поверхности лимфоцитов к настоящему времени обнаружено по крайней мере 40 различных поверхностных клеточных компонентов. Приведенная классификация весьма полезна, но ее не следует считать строгой. Так, представления о тканевом распределении антигенов постоянно изменяются по мере увеличения чувствительности методов, меняется также номенклатура, а появление новых моноклональных антител скорее всего изменит эту классификацию в ближайшие несколько лет.

17.2. Определения и принципы получения и анализа антител

Получение моноклональных антисывороток позволило преодолеть многие трудности, связанные с использованием обычных антисывороток против Ly (см. ниже). Однако хотя моноклональные антитела получены еще не для всех специфичностей Ly, их использование пока не привело к пересмотру описанных ниже принципов и методов тестирования обычных сывороток, за, возможно, одним лишь исключением (адсорбция сыворотки).

17.2.1. Определения

Для тестирования аллоантисывороток используют несколько моделей и несколько основных генетических принципов. Прежде чем познакомиться с ними, рассмотрим некоторые принятые определения. Инбредными называют линии животных, полученных в результате 12—20 скрещиваний между братьями и сестрами. Такие линии гомозиготны по всем генетическим локусам.

Конгенные линии — это линии, полученные в результате возвратного скрещивания одной линии с другой (12 или более раз) при отборе потомства с определенным признаком. Например, линия СЗН.В6-Ly-6 — это линия СЗН, несущая вместо своего обычного аллеля *Ly-6^a* аллель *Ly-6^b*, полученный от линии С57BL/6. Такие линии отличаются от родительских только по одному гену или кластеру сцепленных генов. Например, упомянутая линия СЗН.В6-Ly-6^b отличается от линии СЗН только по локусу *Ly-6* и тесно сцепленным локусам. При получении конгенной линии несцепленные гены выполняют роль «пассажира» и могут сохраниться только случайно. По большинству локусов *Ly* имеются конгенные линии, что создает огромные преимущества при обнаружении и анализе антител *Ly*. Рекомбинантными инбредными (RI) называют линии, которые были получены скрещиванием сестер и братьев в поколении F₂. Эти линии отличаются друг от друга, поскольку они несут разные комбинации аллелей тех локусов, по которым различались родительские линии. Разные комбинации возникают в результате различных способов рекомбинации при получении линий. Первой описанной группой были линии СХВ, выведенные Бэйли (см. [1]). Они включают 7 линий СХВD, E, G, H, I, J, K, полученных от родителей BALB/c и С57BL/6. Картина реакций, наблюдаемых при изучении этих линий, имеет чрезвычайно важное значение для определения идентичности или сцепленности генов, кодирующих разные признаки [1]. К настоящему времени введено по меньшей мере 6 разных групп линий RI. Возвратным скрещиванием называют скрещивание ($A \times B$) $F_1 \times AA$, т. е. скрещивание гибрида F₁ с одним из родителей. В потомстве от такого скрещивания будут и AB (50%), и AA (50%). Иными словами, 50% потомства будут нести аллель B и 100% — аллель A. Поскольку все известные мембранные антигены экспрессируются как доминантные гены, этот тип скрещивания позволяет обнаружить сегрегацию одиночного гена. Число локусов, контролирующих те мембранные антигены, которые различаются в родительских линиях, можно определить с помощью следующей формулы:

$$\text{Доля положительного потомства} = (1/2)^n$$

где n — число сегрегирующих генов. Этот тип скрещивания может применяться для определения сцепленности или взаимосвязи двух различных генов.

17.2.2. Методы

Основным методом обнаружения антигенов клеточной мембраны служит цитотоксический тест, в котором антитела и кроличий комплемент вызывают лизис клеток, измеряемый по поглощению клетками трипанового синего или по выходу из клеток ⁵¹Cr. Используются и другие методы, такие, как флуоресценция и связывание антител, меченных радиоактивными изотопами. В последнее время для тестирования антител стали использовать также проточную микрофлуориметрию (гл. 29) и определение молекулярной природы антигена клеточной мембраны. Молекулярную массу таких антигенов можно определять, вводя радиоактивную метку в антиген либо прямо на поверхности (при помощи ¹²⁵I в реакции, катализируемой лактопероксидазой), либо «изнутри» (используя ³⁵S-метионин или другие аминокислоты). Клетки солибилизируют детергентом (обычно нонидетом Р-40), в раствор добавляют антитела и получают преципитат. Этот материал растворяют кипячением в растворе додецилсульфата натрия (ДСН) и подвергают электрофорезу в присутствии ДСН. Молекулярную массу определяют по относительной подвижности меченого антигена.

17.2.3. Принципы и проблемы

Ранее мы уже обсуждали проблемы, связанные с использованием обычных антисывороток [1] (табл. 17.2). Получение моноклональных антисывороток позволило преодолеть многие из этих проблем (гл. 28) — такие, как полиспецифичность антисывороток, наличие в антисыворотках противовирусных анти-тел и аутоантител, осложнения, возникающие при повторном получении антисывороток с теми же свойствами или при получении этих сывороток в больших

Таблица 17.2. Принципы анализа мышиных аллоантисывороток

Метод исследования	Получаемая информация
Распределение по линиям Инбредные Конгенные Рекомбинантные инбредные (РИ) Возвратные скрещивания	Уникальное распределение по линиям указывает на наличие нового локуса: исследование конгенных линий выявляет идентичность или сцепленность исследуемого локуса с известными локусами; с помощью РИ-линий определяется сцепленность; возвратные скрещивания указывают число локусов, определяющих данный признак, и наличие сцепленности с известными генетическими маркерами Определяется распределение антигена. Иногда два антигена имеют одинаковое распределение по линиям, но разное распределение по тканям: в этом случае они, по-видимому, являются продуктами разных локусов
Распределение по тканям Лимфоидные ткани (тимус, лимфатические узлы, селезенка, костный мозг, кровь) Другие ткани (почки, печень, сердце и т. д.)	Определяется распределение антигена. Иногда два антигена имеют одинаковое распределение по линиям, но разное распределение по тканям: в этом случае они, по-видимому, являются продуктами разных локусов
Адсорбция клетками разных линий и тканей	Необходима для очистки многокомпонентных аллоантисывороток; не требуется для моноклональных антисывороток, кроме тех случаев, когда устанавливаются слабая перекрестная реактивность или различия в экспрессии антигена
Химическое строение Одномерный и двумерный электрофорез в восстанавливающих условиях и в нативной форме	Уникальная полоса или пятно на геле указывает на молекулярную массу антигена и свидетельствует об уникальности соответствующего гена; определяются наличие связей —S—S—, внутриклеточное или поверхностное расположение антигена; анализ молекул предшественников антигена
Поверхностное и внутреннее «мечение» молекулы	Распределение по клеткам, плотность антигена, разделение клеток для функционального анализа
Эксперименты с импульсной меткой	Взаимоотношения разных эпитопов на одной молекуле, определение аффинности
Проточная микрофлуориметрия	Определение функциональной активности субпопуляции, несущей данный антиген
Анализ связывания разных радиоактивно меченных моноклональных антител	
Функциональные тесты	

количествах, и, наконец, необходимость адсорбировать сыворотки для получения антител требуемой специфичности. В то же время при работе с моноклональными антителами приходится по-прежнему проводить тестирование на животных множества различных линий, включая конгенные и рекомбинантные линии, на различных тканях животных одной линии (как лимфоидных, так и нелимфоидных). Иными словами используются те же принципы, что и при работе с обычными антисыворотками, но отпадает необходимость адсорбировать сыворотки. Использование моноклональных антител легло в основу несколь-

ких новых методов. Один из них заключается в следующем: исследуют соотношение различных эпитопов на одной молекуле, определяя способность одного моноклонального антитела подавлять связывание с тем же антигеном другого радиоактивно меченного моноклонального антитела.

Получено множество ксеногенных моноклональных антител, распознающих «мономорфные» детерминанты. Так, например, крысиные антитела к мышинному антигену Ly-5 (Т-200) распознают на этой молекуле такую детерминанту (или детерминанты), которая имеется у мышей всех линий. Моноклональные же аллоантисыворотки распознают «полиморфные» детерминанты этого антигена (Ly-5.1 и Ly-5.2). Поскольку антисыворотки двух этих типов реагируют с разными детерминантами на одной и той же молекуле, их используют в различных случаях.

17.3. Описание мембранных антигенов клеток мыши

Вся остальная часть этой главы посвящена описанию индивидуальных антигенов лимфоцитов, включая их генетическое поведение, химическое строение и использование антител к этим поверхностным антигенам для анализа и манипулирования функциональными субпопуляциями лимфоцитов.

Распределение уже известных поверхностных лимфоцитарных антигенов на клетках чрезвычайно разнообразно. Они могут быть равномерно распределены на всех лимфоцитах, а могут обнаруживаться только у Т- или В-лимфоцитов или даже у какой-то одной их субпопуляции (табл. 17.1). Среди антигенов Ly наиболее хорошо охарактеризованы антигены Ly-1, Ly-2 и Ly-3 и в настоящее время они представляют наибольший интерес, так как обнаруживаются на функциональных субпопуляциях Т-лимфоцитов. Таким образом, антигенные системы Ly-1, Ly-2 и Ly-3 можно рассматривать как прототип для манипулирования функциональными Т-лимфоцитами. Насущная задача классификации функциональных лимфоцитов на основе набора их поверхностных антигенов привела к выявлению многих новых молекул клеточной мембраны. Другие антигенные системы, хотя и не позволяют столь же уверенно дифференцировать субпопуляции лимфоцитов и не были столь подробно охарактеризованы, могут тем не менее в конечном счете оказаться не менее полезными, чем аллоантигены Ly-1, Ly-2 и Ly-3. Наконец, следует подчеркнуть, что, за редким исключением, функции поверхностных молекул лимфоцитов неизвестны. Следует, однако, помнить, что гены, кодирующие многие из этих поверхностных антигенов, сцеплены, а возможно, и идентичны генам, кодирующим молекулы, важные для иммунологических реакций. Свойства этих молекул показаны в табл. 17.3 и 17.4.

17.3.1. Аллоантигены, обнаруживаемые либо на Т-лимфоцитах, либо как на Т-, так и на В-клетках

17.3.1.1. *Thy-1*

Локус *Thy-1* имеет историческое значение, поскольку это был первый выявляемый серологическими методами антиген мыши, распределение которого среди лимфоцитов оказалось неравномерным [4]. Он обнаруживается на всех тимocyтах и периферических Т-клетках, а антитела к *Thy-1* и комплемент полностью подавляют все Т-клеточные функции. Он не обнаруживается на В-лимфоцитах, т. е. мышинные Т-клетки имеют фенотип $Thy-1^+Ig^-$ (иммуногло-

Таблица 17.3. Описание локусов, кодирующих антигены мышиных лимфоцитов¹⁾

Локус	Аллели	Специфичность	Хромосома	Мол. масса	Функциональные и др. клетки
<i>Thy-1</i>	<i>Thy-1^a</i> <i>Thy-1^b</i>	Thy-1.1 Thy-1.2	9	19—25 кДа	Все Т-клетки; эпителиальные клетки мозга
<i>Thy-2</i>	<i>Thy-2^a</i> <i>Thy-2^b</i>	Thy-2.1 Thy-2.2	17	150 кДа	Тимус, мозг
<i>Ly-1</i>	<i>Ly-1^a</i> <i>Ly-1^b</i>	Ly-1.1 Ly-1.2	19	67 кДа	Все Т-клетки; Тс—мало Ly-1, Th—много Ly-1
<i>Ly-2</i>	<i>Ly-2^a</i> <i>Ly-2^b</i>	Ly-2.1 Ly-2.2	6	35 кДа×2 30 кДа×2	Субпопуляции Т-клеток, Тс и Ts—Ly-2 ⁺ 3 ⁺ ; рецептор Тс
<i>Ly-3</i>	<i>Ly-3^a</i> <i>Ly-3^b</i>	Ly-3.1 Ly-3.2	6	Как у Ly-2	Как у Ly-2
<i>Ly-4</i>	<i>Ly-4^a</i> <i>Ly-4^b</i>	Ly-4.1 Ly-4.2	2	?	Все В-клетки: В>Т: родство с H-3, β ₂ m?
<i>Ly-5</i>	<i>Ly-5^a</i> <i>Ly-5^b</i>	Ly-5.1 Ly-5.2	1	200 кДа	Молекула T200, Т-клетки > > В-клетки НК ⁺
<i>Ly-6</i>	<i>Ly-6^a</i> <i>Ly-6^b</i>	Ly-6.1 Ly-6.2	4?	33,5 кДа	Почки, большинство Т- и В-клеток отсутствует у предшественников Тс, Th, Ts
<i>Ly-7</i>	<i>Ly-7^a</i> <i>Ly-7^b</i>	Не обнаружена Ly-7.2	12	?	Большинство Т- и В-клеток Т _х ⁺ , Т _с ⁻
<i>Ly-8</i>	<i>Ly-8^a</i> <i>Ly-8^b</i>	Не обнаружена Ly-8.2	? Сцеплен с <i>Ly-6</i>	?	?
<i>Ly-9</i>	<i>Ly-9^a</i> <i>Ly-9^b</i>	Ly-9.1 Ly-9.2	1 Сцеплен с <i>MI</i> s	100 кДа	Т-клетки, В-клетки, тимус
<i>Ly-10</i>	<i>Ly-10^a</i> <i>Ly-10^b</i>	Ly-10.1 Не обнаружена	19	?	Большинство Т-клеток, некоторые В-клетки
<i>Ly-11</i>	<i>Ly-11^a</i> <i>Ly-11^b</i>	Ly-11.1 Ly-11.2	?	18—22 кДа	Тимус, почки
<i>Ly-12</i>	<i>Ly-12^a</i> <i>Ly-12^b</i>	Ly-12.1 Не обнаружена	19	?	Только лимфоидные клетки
<i>Ly-13</i>	<i>Ly-13^a</i> <i>Ly-13^b</i>	Ly-13.1 Не обнаружена	?	?	Тимус, лимфоциты, почки, печень, др. ткани
<i>Ly-14</i>	<i>Ly-14^a</i> <i>Ly-14^b</i>	Не описана Ly-14.2	7 Сцеплен с <i>c</i>	73 кДа	Тимус, лимфоциты, почки, печень, мозг
<i>Ly-15</i>	<i>Ly-15^a</i> <i>Ly-15^b</i>	Ly-15.1 Ly-15.2	7?	150 кДа	Тимус, Т- и В-клетки

Таблица 17.3. (продолжение)

Локус	Аллели	Специфичность	Хромосома	Мол. масса	Функциональные и др. клетки
<i>Ly-16</i>	<i>Ly-16^a</i> <i>Ly-16^b</i>	Не обнаружена <i>Ly-16.2</i>	?	?	?
<i>Ly-m18</i>	<i>Ly-m18^a</i> <i>Ly-m18^b</i>	Не обнаружена <i>Ly-m18.2</i>	? Сцеплен с <i>Ltw</i>	?	T- и B-клетки, мозг, почки, печень
<i>Ly-m19</i>	<i>Ly-m19^a</i> <i>Ly-m19^b</i>	Не обнаружена <i>Ly-m19.2</i>	4 Сцеплен с <i>Lyb-2</i>	?	Только B-клетки
<i>Ly-m20</i> ²⁾	<i>Ly-m20^a</i> <i>Ly-m20^b</i>	<i>Ly-m20.1</i> <i>Ly-m20.2</i>	1 Сцеплен с <i>Mls</i>	?	T- и B-клетки

¹⁾ Описание антигенов Ia, Tla и Qa см. в гл. 13 и 14.

²⁾ Антигенная система *Ly-m20*, по-видимому, идентична *Ly-17* (см. текст).

Таблица 17.4. Описание антигенных локусов B-клеток мыши ¹⁾

Локус	Аллели	Специфичность	Хромосома	Мол. масса	Функция
<i>Lyb-2</i>	<i>Lyb-2^a</i> <i>Lyb-2^b</i> <i>Lyb-2^c</i> <i>Lyb-2^d</i>	<i>Lyb-2.1</i> <i>Lyb-2.2</i> <i>Lyb-2.3</i> Нет	4	45 кДа?	Анти- <i>Lyb-2</i> подавляет образование антител in vitro
<i>Lyb-3</i>	Нет	<i>Lyb-3</i>	?	68 кДа	Участвует в активации клеток антигеном
<i>Lyb-4</i>	<i>Lyb-4^a</i>	<i>Lyb-4.1</i>	4	?	Передача второго сигнала в РСЛ
<i>Lyb-5</i>	<i>Lyb-5^a</i> <i>Lyb-5^b</i>	<i>Lyb-5.1</i> <i>Lyb-5.2</i>	?	?	?
<i>Lyb-6</i>	<i>Lyb-6^a</i>	<i>Lyb-6.1</i>	?	45 кДа	?
<i>Lyb-7</i>	<i>Lyb-7^a</i>	<i>Lyb-7.1</i>	12	?	Анти- <i>Lyb-7</i> подавляет образование антител
<i>Pca-1</i>	<i>Pca-1^a</i>	PC-1	?	110 кДа	?
<i>Pca-2</i>	Нет	PC-2	?	?	?
<i>Ly-17</i> <i>Ly-m20</i> ²⁾	<i>Ly-17^a</i> <i>Ly-17^b</i>	<i>Ly-17.1</i> <i>Ly-17.2</i>	1	?	?
<i>LyM-1</i>	<i>LyM-1^a</i> <i>LyM-1^b</i> <i>LyM-1^c</i>	<i>LyM-1.1</i> <i>LyM-1.2</i> <i>LyM-1.3</i>	1	?	Стимулирует РСЛ

¹⁾ *Lyb-1*: см. *Ly-4* (табл. 17.3).

²⁾ *Ly-m20* и *Ly-17*, вероятно, представляют собой идентичные гены (см. текст).

булин), а В-клетки — фенотип Thy-1-Ig⁺ [5]. Таким образом, использование антисыворотки к антигену Thy-1 наряду с типированием поверхностных Ig сыграло важную роль в выяснении существования двух путей дифференцировки лимфоцитов: в Т- и В-клетки. Первоначально Thy-1 был назван θ (тэта). Локус *Thy-1* расположен в хромосоме 9 около локусов *d* (*dilute*) и *Mod 1* (малат-дегидрогеназа декарбоксилирующая). У этого локуса есть два аллеля: *Thy-1^a* и *Thy-1^b*, соответственно кодирующие специфичности Thy-1.1 и Thy-1.2. Мыши почти всех линий имеют фенотип Thy-1.2⁺ и лишь немногие — Thy-1.1⁺ (табл. 17.5). Первая антисыворотка к Thy-1 была получена как СЗН-анти-АКР

Таблица 17.5. Распределение мембранных антигенов мышьяных клеток по линиям¹⁾

Антиген	C57L/6	C57BR	BALB/c	C3H	A	DBA/2	129/J	AKR	SJL
Thy-1	2	2	2	2	2	2	2	1	2
Thy-2	2	—	2	2	2	2	—	2	—
Ly-1	2	2	2	1	2	1	2	2	2
Ly-2	2	2	2	1	2	1	2	1	2
Ly-3	2	2	2	2	2	2	2	1	2
Ly-4	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Ly-5	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Ly-6	2	2	1	1	1	2	2	2	2
Ly-7	—	2	2	2	2	2	2	2	2
Ly-8	2	2	1	1	1	2	2	2	2
Ly-9	2	2	1	1	1	1	H. O.	1	1
Ly-10	—	—	—	1	—	1	—	—	—
Ly-11 ²⁾	2	2	2	2	2	2	1	2	2
Ly-m11 ²⁾	2	2	—	—	—	—	—	—	—
Ly-11 (Меру-ло) ²⁾	2	2	—	—	—	2	2	2	2
Ly-12	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Ly-13	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Ly-14	2	2	—	2	2	2	—	—	—
Ly-15	2	2	1	2	2	2	2	1	1
Ly-16	2	—	2	2	2	?	H. O.	2	2
Ly-m18	2	2	—	—	—	2	—	—	2
Ly-m19	2	2	2	2	2	2	2	—	—
Lna-1	2	H. O.	—	—	—	—	H. O.	—	—

1) Прочерк означает наличие лишь одной серологически выявляемой специфичности. Некоторые сублинии представленных линий имеют иной характер экспрессии антигенов, чем родительские линии; H. O. — не определяли.

2) Описаны три антигена Ly-II; см. сноску к табл. 17.1.

(анти-Thy-1.1) и АКР-анти-СЗН (анти-Thy-1.2.), называемые также анти- θ -АКР и анти- θ -СЗН соответственно. Антисыворотки легко получить, используя комбинации этих линий или конгенные линии после нескольких инъекций тимоцитов. В настоящее время получены также моноклональные антитела. Большинство антител к Thy-1 относится к классу IgM, что создает проблему стабильности при их длительном хранении.

Поскольку Thy-1 имеется только на Т-клетках и его нет на В-клетках, представляет интерес тот факт, что у голых (nude) мышей часть клеток содержит небольшое количество Thy-1. Считается, что эти клетки представляют собой протимоциты. Возможно, под влиянием тимуса или при прохождении через тимус (где тимоциты имеют высокую концентрацию Thy-1) эти протимоциты

дифференцируются в тимоциты и приобретают высокую концентрацию *Thy-1*. У периферических Т-клеток количество *Thy-1* вновь уменьшается. Хотя среди лимфоцитов *Thy-1* обнаружен только на Т-клетках, он выявляется также во многих нелимфоидных тканях, включая мозг, клетки эпидермиса, фибробласты, клетки карциномы молочной железы и скелетные мышцы эмбрионов [1]. У крыс также обнаружен *Thy-1.1*, но не *Thy-1.2*. Более того, у крыс *Thy-1* имеется не только в мозге или на тимоцитах, но также на 40% клеток костного мозга, и при этом лишь на очень небольшой части клеток лимфатических узлов [1]. Таким образом, у крыс *Thy-1* нельзя рассматривать как специфический маркер Т-лимфоцитов.

О химической структуре детерминанты *Thy-1* данные противоречивы, хотя похоже, что эта молекула представляет собой гликопротеин с мол. массой 19–20 кДа, связанный с гликолипидом. Противоречия эти обусловлены, по всей видимости, различием методов, используемых для выделения антигена из разных тканей. Определение аминокислотной последовательности молекулы *Thy-1* выявило наличие некоторой гомологии с участками β -слоев константных доменов иммуноглобулинов. Заманчиво предположить, что эти молекулы произошли из общего предшественника и имеют сходные функции. Следует также заметить, что с локусом *Thy-1* ассоциирован локус гистосовместимости (эти локусы, возможно, совпадают): трансплантаты между линиями, конгенными по *Thy-1*, хотя и медленно, но отторгаются.

Использование антисыворотки к *Thy-1.2* *in vivo* для подавления Т-клеточных функций было не очень успешным — моноклональные антитела к другим антигенам *Ly* более эффективны (см. ниже). Ясно также, что с помощью антител к *Thy-1* можно различать популяции лимфоцитов, например разделять Т- и В-клетки, но они одинаковым образом реагируют с разными функциональными Т-клетками.

17.3.1.2. *Thy-2*

Этот локус был недавно идентифицирован с помощью антител, «загрязняющих» антисыворотку к *H-2.4* (*H-2.4* — это частный случай специфичности *H-2D^d*) [6]. Локус *Thy-2* расположен в хромосоме 17, на 3 сантиморганиды правее локуса *H-2K*. Анализ рекомбинантных инбредных мышей *AKXL* показал, что локус *Thy-2* картируется также правее локусов *Tla* (антиген тимусной лейкемии) и *Pgk-2* (фосфоглицераткиназа-2). Антиген *Thy-2* уникальным образом распределен по разным линиям (табл. 17.5). Он экспрессируется в тимусе, ткани мозга и в меньшей степени в костном мозге и на клетках селезенки. Он не обнаруживается в лимфатических узлах, печени и на эритроцитах. *Thy-2* — это полипептид с мол. массой 150 кДа, расположенный на поверхности тимоцитов. С антисывороткой не было проведено никаких функциональных исследований, и к настоящему времени описан только один аллель этого локуса.

17.3.1.3. *Ly-1*

Локусы *Ly-1* и *Ly-2* были впервые описаны в 1968 г; оба оказались специфичными для лимфоцитов [7]. Различное распределение этих антигенов среди функциональных субпопуляций Т-клеток — хелперов, супрессоров и цитотоксичных Т-лимфоцитов — вызвало новую волну интереса к иммуногенетике клеточной мембраны [8, 9]. Локус *Ly-1* расположен в хромосоме 19 рядом с локусом *ru* (*ruby-eye*) (табл. 17.3), и, как и большинство других локусов *Ly*, содержит два аллеля, *Ly-1^a* и *Ly-1^b*, кодирующие специфичности *Ly-1.1* и *Ly-1.2*

соответственно. У большинства линий обнаруживается специфичность Ly-1.2, и только СЗН, СВА, DBA/1 и DBA/2 несут специфичность Ly-1.1 (табл. 17.6). К настоящему времени уже получены конгенные линии, антисыворотки к Ly-1.1 с высоким титром и антисыворотки к Ly-1.2 с меньшим титром, а также моноклональные антитела к обоим специфичностям (табл. 17.6). Молекула

Таблица 17.6. Моноклональные антитела к поверхностным антигенам мышиных лимфоцитов

Локус	Специфичность	Локус	Специфичность
<i>Ly-1</i>	Ly-1.1	<i>Ly-m10</i>	Ly-m10.1
	Ly-1.2 Ly-1 (мономорфная)	<i>Ly-m11</i>	Ly-m11.2
<i>Ly-2</i>	Ly-2.1	<i>Ly-m15.2</i>	Ly-15.2
	Ly-2.2 Ly-2 (мономорфная)	<i>Ly-m18</i>	Ly-m18.2
<i>Ly-3</i>	Ly-3.1	<i>Ly-m19</i>	Ly-m19.2
	Ly-3.2	<i>Ly-m20</i>	Ly-m20.2
<i>Ly-5</i>	Ly-5.1		
	Ly-5.2 Ly-5 (мономорфная)		
<i>Ly-6</i>	Ly-6.2		
<i>Ly-7</i>	Ly-7.2		
<i>Ly-9</i>	Ly-9.1		
	Ly-9.2		

Ly-1 представляет собой гликопротеин весом 67 кДа — эта молекула может быть также выявлена с помощью ксеногенных моноклональных антител, узнающих мономорфную детерминанту Ly-1.

Первые работы по цитотоксическому анализу показали, что Т-лимфоциты лимфатических узлов можно разделить на три различные популяции: $Ly-1^{+}2^{+}3^{+}$ (50—55%), $Ly-1^{+}2^{-}3^{-}$ (30—35%) и $Ly-1^{-}2^{+}3^{+}$ (5—10%). Анализ распределения Ly-1 и Ly-2 на функциональных Т-лимфоцитах показал, что хелперные Т-клетки имеют фенотип $Ly-1^{+}2^{-}$, в то время как цитотоксичные Т-клетки — фенотип $Ly-1^{-}2^{+}$, а супрессорные Т-клетки — $Ly-1^{-}2^{+}1-J^{+}$ (табл. 17.7). Таким образом, используя антисыворотки к Ly-1, Ly-2 и I-J, эти три субпопуляции можно легко различить как непосредственно, так и в функциональных тестах, используя антитела и кроличий комплемент для типирования клеток. В последнее время использование других, более чувствительных методов показало, что Ly-1 присутствует на большинстве, если не на всех Т-лимфоцитах: проточный микрофлуориметрический анализ не выявляет клеток $Ly-1^{-}$ [10, 11]. Показано, однако, что Ly-1 по-разному экспрессируется на разных Т-лимфоцитах: экспрессия Ly-1 у большинства периферических Т-клеток достигает высокого уровня, а тимоциты содержат этот антиген в меньшем количестве. Среди периферических Т-клеток есть, однако, небольшая доля, у которых Ly-1 удается обнаружить в очень небольшом количестве. Эти клетки обычно не подвергаются лизису при

действию антител и комплемента и, следовательно, имеют фенотип $Ly-1^-$, хотя, быть может, правильнее их называть $Ly-1^\pm$ [10]. Таким образом, применение более чувствительных методов при изучении связывания антител с клетками привело к некоторому изменению наших ранних представлений об экспрессии $Ly-1$ на Т-лимфоцитах. Тем не менее когда применяют лизис с помощью антител и комплемента, то исходные наблюдения обычно оказываются справедливыми.

Таблица 17.7. Типирование функциональных популяций Т-клеток антисыворотками к Ly

	L-1	Ly-2/3	Ly-5	Ly-6	Ly-7
Т-хелперы (образование анти- тел)	+	—	+	+	—
Цитотоксические Т-клет- ки (Тс)					
Хелпер предшест- венника	+	—	+	?	—
Хелпер эффектора	+	—	+	—	+
Супрессор	—	+	+	+	—
Предшественник эф- фектора	— или $\pm$	+	+	$\pm$ или — ¹⁾	?
Эффектор	— или $\pm$	+	+	+	?
Т-супрессоры (образование анти- тел)	—	+	+	?	?
Т-клетки ГЗТ					
Эффектор	+	—	Н. О.	Н. О.	Н. О.
Супрессор	+	—	+	—	—
Т-клетки отторжения трансплантата					
Обычное отторжение	+	$\pm$	?	?	?
Сенсибилизирован- ное отторжение	+	—	+	+	$\pm$
Т-клетки, реагирующие на митогены					
ФГА	+	+	+	+	—
Кон А	+	+	+	+	+
Митоген лаконоса	+	+	+	+	—
Реакция смешанных Т-лимфоцитов					
Стимулирующие клетки	—	—	?	—	—
Реагирующие клетки	+	—	?	+	+

¹⁾ Наличие $Ly-6$ у предшественников Th зависит от экспериментальной системы [1—3].

Совсем недавно было установлено, что $Ly-1$ не может служить строго специфическим маркером Т-клеток — некоторые В-клеточные опухоли также несут антиген $Ly-1$ [12]. В заключение следует сказать, что моноклональные антитела к $Ly-1$ в отличие от антисывороток к $Thy-1$ активны и *in vivo*. Они уничтожают клетки, участвующие в большинстве Т-клеточных функций, включая хелперную функцию, образование цитотоксичных Т-клеток и отторжение трансплантата [13].

17.3.1.4. *Ly-2/3*

Локусы *Ly-2* и *Ly-3* тесно сцеплены и расположены в хромосоме 6. Они сцеплены с локусами регулятора-1 лактатдегидрогеназы (*Ldr-1*) и микрофталмий (*mi*). Интересен тот факт, что гены *Ly-2/3* также тесно сцеплены с генами, отвечающими за полиморфизм легких цепей иммуноглобулинов [14] (табл. 17.8). У локусов *Ly-2* и *Ly-3* есть по два аллеля: *Ly-2^a* и *Ly-2^b*, *Ly-3^a* и *Ly-3^b*

Таблица 17.8. Кластеры генов, кодирующих антигены клеточной поверхности (по [3])

Гены	Хромосома
<i>H-2, Ia, IIa, Qa, 1, 2, 3, 4, 5, Thy-2</i>	17
<i>H-3, β_2M, Ly-m11, Ly-4, Ir-2</i>	2
<i>Ly-6, H9/25, ThB, Ly-11</i>	?
<i>MiS, LyM-1, Ly-9, Ly-m10, Ly-5</i>	1
<i>Ly-1, Ly-m10</i>	19
<i>Ly-2, 3, IB, Pc-8</i>	6
<i>Ly-b2, Lyb-4, Lyb-6, Ly-m19</i>	4

кодирующие специфичности *Ly-2.1*, *Ly-2.2*, *Ly-3.1* и *Ly-3.2* соответственно. Локусы *Ly-2* и *Ly-3* никогда не удавалось разделить при рекомбинации, а их продукты физически ассоциированы на клеточной поверхности. Антисыворотки к *Ly-2* и *Ly-3*, полученные стандартными способами, как правило, имели низкий титр, но эта проблема была преодолена с помощью моноклональных антител (табл. 17.3). В отличие от антигена *Ly-1*, который обнаруживается практически у всех Т-клеток, антигены *Ly-2/3* выявляются только у 90% тимоцитов и 50—70% периферических Т-клеток. У В-клеток эти антигены полностью отсут-

Таблица 17.9. Распределение некоторых мембранных антигенов на лимфоцитах разных тканей ¹⁾

Антиген	Тимус	Лимфатический узел		Селезенка		Костный мозг
		Т-клетки	В-клетки	Т-клетки	В-клетки	
Thy-1	> 99 ²⁾	> 95	0	> 99	0	12
Ly-1	> 99	> 99	0	> 99	0	12
Ly-2/3	90	50—70	0	45—70	0	Н. О.
Ly-4	10	90	90	90	90	
Ly-5	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 90
Ly-6	10	> 95	> 95	> 95	> 95	
Ly-7	10	90	80	90	80	
Ly-b2	0	Н. О.?	Н. О.?	< 10	> 95	40
Ly-b3	0	Н. О.?	Н. О.?	0	30—35	2
Ly-b4	0	—	+	—	+	7
Ly-b5	0	Н. О.?	Н. О.?	5	60	Н. О.?
LyM-1	0	Н. О.?	?	0	+	75
Lpa-1	0	34—40	30—40	0	0	0
PC.1	0	Н. О.?	Н. О.?	0	Плазматические клетки	0

¹⁾ Н. О. — не определяли.

²⁾ Доля клеток в ткани, несущих данный антиген, %.

ствуют (табл. 17.9). Очевидно, эти антигены характеризуют определенные субпопуляции Т-лимфоцитов. Хотя $Ly-1$, как сейчас выяснилось, имеется на всех Т-клетках (клетки $Ly-1^-$ на самом деле представляют собой $Ly-1^+$; см. выше), в случае $Ly-2$ это оказалось не так. Антисыворотки к $Ly-2$ отличают Т-хелперные клетки ($Ly-1^{+2-}$) от Т-супрессорных ($Ly-1^{-2+}$) и цитотоксичных Т-клеток ($Ly-1^{+2+}$) (табл. 17.7). Таким образом, $Ly-2$ по сравнению с $Ly-1$ представляется более надежным маркером для разделения функциональных субпопуляций Т-лимфоцитов.

Молекулы $Ly-2/3$ имеют весьма сложное строение. Вначале думали, что это молекулы с мол. массой 35 кДа, отличающиеся высокой чувствительностью к трипсину. Однако анализ с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле показал, что комплекс $Ly-2/3$ представляет собой четырехцепочечную структуру, состоящую из гомодимера 30 кДа, ассоциированного с гомодимером 35 кДа. Этот комплекс представляет собой один из немногих гликопротеинов поверхности лимфоцитов, удерживаемых дисульфидными связями [15].

Ограниченность распространения $Ly-2/3$ определенными субпопуляциями лимфоцитов, его сложное химическое строение и сцепленность с локусами легких цепей иммуноглобулинов дали основания думать, что молекула $Ly-2/3$ вовлечена в функционирование этих клеток. В связи с этим интересно будет упомянуть о нескольких сообщениях об угнетении функции цитотоксических Т-клеток антителами к $Ly-2$ в отсутствие комплемента [16, 17]. На основе этих данных было высказано предположение, что $Ly-2$ может быть частью рецептора цитотоксичных Т-клеток.

17.3.1.5. *Ly-4*

Аллоантиген $Ly-4$ был первоначально описан как аллоантиген В-клеток [1]. Однако после применения антисывороток с более высоким титром и более чувствительных методов выявления антител стало ясно, что это не так и что небольшая часть тимоцитов и большинство периферических Т-клеток также имеют фенотип $Ly-4^+$ (табл. 17.9). Вне всякого сомнения, В-лимфоциты экспрессируют больше $Ly-4$, чем Т-лимфоциты, и угнетение антителами к $Ly-4$ функции именно В-, а не Т-лимфоцитов, возможно, объясняется более низкой плотностью антигена на Т-лимфоцитах. В этих работах было обнаружено, что антисыворотки к $Ly-4$ сильно подавляют ответ на В-клеточный митоген липополисахарид (ЛПС) и частично — ответ на Т/В-стимулятор, митоген лаконоса. Кроме того, эти антисыворотки совсем не подавляют или лишь частично угнетают такие реакции Т-клеток, как лизис, вызванный цитотоксичными Т-клетками, или ответ на Т-клеточные митогены, конканавалин А (Кон А) фитогемагглютинин (ФГА). Конечно, в свете последних серологических данных функциональные тесты на Т-клетки необходимо повторить.

Локус $Ly-4$ обнаружен в хромосоме 2 и имеет два аллеля, $Ly-4^a$ и $Ly-4^b$, кодирующие специфичности $Ly-4.1$ и $Ly-4.2$. Фенотип $Ly-4.2^+$ имеют только линии C57BL/6 и родственные линии; все остальные линии содержат $Ly-4.1$ (табл. 17.5). Локус $Ly-4$ сцеплен с локусом $H-3$, кодирующим минорный антиген гистосовместимости. Локусы $Ly-4$ и $H-3$ не удалось разделить рекомбинацией, и все $H-3^a$ -мыши имеют фенотип $Ly-4.2^+$. Очевидно, эти локусы сцеплены очень тесно, а может быть, и идентичны. Более того, ген, кодирующий электрофоретический полиморфизм β -2-микроглобулина (β -2М), сцеплен с $H-3$, и его распределение по линиям мышей совпадает с распределением $Ly-4$. Такое совпадение наблюдается и у рекомбинантных инбредных мышей СХВ. Аллоантиген

Ly-m11, по всей видимости, возникает в результате серологически обнаруживаемого полиморфизма β -2-микроглобулина (см. ниже). Он кодируется геном, сцепленным с *H-3*, и имеет почти такое же распределение по линиям, как и *Ly-4*. Пока не было предпринято исследований, направленных на выяснение точного характера сцепления *Ly-4*, *H-3*, *Ly-m11* и β -2М. Работа такого рода, если ее дополнить соответствующими биохимическими исследованиями, должна, очевидно, дать много ценной информации. В заключение необходимо заметить, что с *Ly-4* сцеплены и некоторые другие интересные локусы. Ген *Ir-2*, контролирующей образование гемагглютинирующих антител в ответ на антиген эритроцитов Ea-1, гены, отвечающие за резистентность к паразитирующему простейшему *Leishmania donovani*, и минорный локус гистосовместимости *H-13* картируются в этом же генном комплексе. Было замечено [3], что комплекс генов *H-3* по своей структуре похож на *H-2*: он содержит гены, кодирующие антигены, широко распространенные (ген *Ly-m11*), ограниченно распространенные (ген *Ly-4*) и гены *Ir* (*Ir-2*). Возможно, этот комплекс играет такую же важную роль в иммунных реакциях.

17.3.1.6. *Ly-5* (T200)

При первоначальном описании аллоантигенной системы *Ly-5* предполагалось, что распространение специфичностей *Ly-5* ограничено Т-лимфоцитами [1,2]. Сейчас, однако, стало ясно, что *Ly-5* — это один из основных компонентов клеточной поверхности Т- и В-лимфоцитов, а также большинства кроветворных клеток, включая промиелоциты, метамиелоциты, макрофаги, эозинофилы и нейтрофилы. У эритроидных клеток этот антиген отсутствует [2]. Он был обнаружен у протимоцитов и во многих лимфоидных и миелоидных опухолях. Экспрессия *Ly-5* на клетках печени и почек, описанная в ранних работах, оказалась связана с проникновением в эти ткани посторонних клеток. В других нелимфоидных тканях *Ly-5* не был обнаружен [2]. Таким образом, распространение молекулы *Ly-5* ограничено лимфоидной и миелоидной линиями дифференцировки. Впервые *Ly-5* появляется в желточном мешке на 8-й день развития, а в эмбриональной печени — на 12-й день.

Локус *Ly-5* расположен в хромосоме 1 и имеет два аллеля *Ly-5^a* и *Ly-5^b*, кодирующие специфичности *Ly-5.1* и *Ly-5.2*. Молекула *Ly-5* — это наиболее биохимически охарактеризованный антиген *Ly*. Специфичности *Ly-5* представляют собой аллельные специфичности молекулы T200, аналог которой был обнаружен и у человека. Молекула T200 мышей, обнаруженная на Т-лимфомах BW5147, оказалась трансмембранным гликопротеином, построенным из а) чувствительного к протеиназе домена, содержащего много фосфосериновых остатков и проникающего в цитозоль, и б) устойчивого к протеиназам фрагмента. Устойчивый фрагмент имеет мол. массу 100 кДа и содержит большую часть олигосахаридных остатков [19]. Мол. масса молекулы *Ly-5* разных клеток значительно варьирует. На тимоцитах она представляет собой гликопротеин весом 200 кДа, а в клетках селезенки антисыворотки к *Ly-5* преципитируют три вида молекул с мол. массой 200, 205 и 220 кДа. При анализе методом пептидных карт с использованием протеиназы V8 *Staphylococcus aureus* не было обнаружено различия в пептидах между мечеными ¹²⁵I тремя видами молекул из селезенки и молекулой из тимуса. В то же время в пептидных картах молекул, полученных от мышей *Ly-5.1* и *Ly-5.2*, наблюдается заметная разница, что указывает на значительные структурные различия между аллелями [20]. Клонированные опухолевые клеточные линии кроветворного происхождения экспрессируют только одну молекулярную форму, хотя пока не известно, что экспрессируют

нормальные клетки разных линий дифференцировки. Итак, либо «ген» *Ly-5* — это на самом деле набор тесно сцепленных генов, кодирующих родственные молекулы с общими аллотипическими детерминантами *Ly-5*, т. е. нечто сходное с генами тяжелых цепей иммуноглобулинов, либо молекула *Ly-5* представляет собой продукт одного гена, по-разному модифицируемый в клетках разных типов. В связи с этим интересно отметить следующее: использование соматического мутанта Т-клеточной лимфомы и комплементационного генетического анализа показало, что может существовать второй ген, определяющий посттрансляционную модификацию молекулы *Ly-5*, предшествующую ее экспрессии на клеточной мембране [21].

Немногочисленные функциональные исследования, проведенные с антисыворотками к *Ly-5*, показали, что *Ly-5* присутствует на хелперных Т-клетках, супрессорных Т-клетках и аллогенных цитотоксических Т-клетках [2]. *Ly-5* является также основным компонентом природных киллеров (ПК), и антитела к *Ly-5* специфично подавляют активность ПК. Можно предполагать, что *Ly-5* (или модифицированный *Ly-5*) является частью рецептора ПК [22].

17.3.1.7. *Ly-6*

Аллоантигенная система *Ly-6* была исследована с помощью обычной алло-антисыворотки. Считалось, что это дифференцировочный маркер Т-лимфоцитов. Однако применение обычных антисывороток лучшего качества и моноклональных антител (табл. 17.6) показало, что, хотя система *Ly-6* имеется только на тех тимоцитах, которые резистентны к кортизону, она присутствует также, хотя и в меньших количествах, на В-клетках. Этот антиген обнаружен также на клетках почки, макрофагах и нейтрофилах [1, 2].

Несмотря на то что он широко распространен в тканях, антиген *Ly-6* оказался удобным маркером во многих функциональных исследованиях Т-клеток) поскольку с его помощью удавалось различать клетки-предшественники (*Ly-6*⁻, и эффекторные клетки (*Ly-6*⁺). Так, например, цитотоксичные Т-клетки, направленные против вируса Сендай, имеют фенотип *Ly-6*⁺, а их предшественники — *Ly-6*⁻. Аналогично этому антигена *Ly-6* нет ни у предшественников аллогенных цитотоксичных Т-клеток, ни у хелперных или супрессорных Т-клеток, участвующих в цитотоксичных реакциях, но эффекторные Т-клетки имеют при этом фенотип *Ly-6*⁺. Таким образом, активированные к *Ly-6* можно с успехом использовать для изучения этого аспекта развития Т-клеток в онтогенезе. *Ly-6* имеется на клетках, активированных ЛПС, ФГА и Кон А. Количество *Ly-6*, экспрессируемого на таких клетках, значительно превышает его количество на нормальных клетках.

Локус *Ly-6* имеет два аллеля, *Ly-6*^a и *Ly-6*^b, кодирующие специфичности *Ly-6.1* и *Ly-6.2*. По всей видимости, «область» *Ly-6* — это генетически сложная область, содержащая несколько генов, кодирующих аллоантигены клеточной мембраны. Первоначально было независимо описано несколько систем аллоантигенов, которые, как сейчас стало ясно, почти наверняка идентичны *Ly-6*. Речь идет о системах DAG, Ren-1 и Ala-1 [2]. Однако проводимые в последнее время опыты с применением моноклональных антител указывают на существование нескольких других локусов, тесно сцепленных с локусом *Ly-6*. Это — *Ly-8*, H9/25, ген, регулирующий экспрессию антигена Thb, *Ly-11* [23]¹ и, воз-

¹ К сожалению, символом *Ly-11* были названы три различных локуса, которые не следует путать. Это локус *Ly-11* (Меруло и др. [23]), сходный с *Ly-6*; *Ly-11* Поттера и Мак-Кензи [30] и *Ly-m11* Тады и др., который, возможно, представляет собой ген β -2M у мышей (см. обзор [3]).

можно, еще один локус, сходный с *Ly-6* и недавно описанный с помощью новых моноклональных антител [24]. Эти гены не удалось разделить рекомбинацией, и распределение их аллельных продуктов по линиям идентично распределению *Ly-6*. Исключение составляют линия RF, у которой антигены *Ly-6* и *Ly-8* различаются, и линия SWR, у которой произошло разделение локусов *Ly-6* и *Ly-11* Меруло. Хотя между этими аллоантигенами были найдены небольшие различия по тканевому распределению и функции, соотношение между ними пока точно не установлено. Для этого требуются соответствующие биохимические исследования. Что касается биохимии, то здесь имеются противоречивые данные. В первом сообщении [25] было показано, что *Ly-6.2* — это гликопротеин с мол. массой 78 кДа (он был выявлен с помощью обычной антисыворотки), однако недавно был выделен гликопротеин с мол. массой 33,5 кДа ([26], а также V. Sutton, G. Tobias и C. Mickelson, личное сообщение).

Итак, аналогично комплексу *Ly-4* (см. выше) комплекс *Ly-6* представляет собой кластер тесно сцепленных генов, участвующих в образовании или контроле различных молекул клеточной мембраны.

17.3.1.8. *Ly-7*

Локус *Ly-7* был обнаружен с помощью обычных антисывороток, полученных при взаимных иммунизациях между рекомбинантными инбредными мышами СХВ Бэйли [27]. Была обнаружена только одна специфичность *Ly-7.2* и все линии, за исключением C57BL/6, C57BL/10 и C58, имели фенотип *Ly-7.2*⁺ (табл. 17.5). Неоднократные попытки получить антисыворотки к *Ly-7.1* не увенчались успехом. Иммунный ответ на аллоантиген *Ly-7.2* находится под контролем МНС: мыши с локусом *H-2^b* дают много цитотоксичных антител, мыши с локусом *H-2^d* отвечают слабо, а мыши других линий совсем не отвечают на этот антиген. Ответственный за это ген картируется в области *E/C* комплекса *H-2*. Недавно были описаны моноклональные антитела к *Ly-7.2* (L. Lanier, личное сообщение). *Ly-7* обнаруживается на подавляющем большинстве (80—90%) как Т-, так и В-клеток, причем В-клетки экспрессируют в четыре раза больше *Ly-7*, чем Т-клетки. *Ly-7* обнаруживается только у лимфоцитов и отсутствует у эритроцитов, макрофагов, эозинофилов, нейтрофилов, клеток мозга, почек и печени.

Анализ функциональных Т-клеток показывает, что антиген *Ly-7* может быть использован для выявления клеток разных типов, участвующих в образовании аллогенных цитотоксичных Т-лимфоцитов. Хелперные Т-клетки имеют фенотип *Ly-7*⁺, а супрессорные — *Ly-7*⁻. Цитотоксичные Т-клетки и их предшественники в этой экспериментальной системе также имеют фенотип *Ly-7*⁻ (табл. 17.7). Клетки, реагирующие на Т-клеточные митогены ФГА и Кон А, имеют фенотип *Ly-7*⁻ и *Ly-7*⁺ соответственно, а бластные клетки, индуцированные обоими митогенами, — *Ly-7*⁺ (табл. 17.7). Очевидно, что с помощью аллоантигена *Ly-7* можно различать Т-клетки, имеющие разные функции, и он может оказаться полезным инструментом для манипулирования этими клетками. Функциональное тестирование *Ly-7* на В-клетках было проведено в небольшом объеме. При этом выяснилось, что *Ly-7* отсутствует у клеток, реагирующих на ЛПС, но экспрессируется на бластных клетках, индуцированных ЛПС, а также на клетках, синтезирующих антитела IgM.

17.3.1.9. *Ly-9*

Система аллоантигена *Ly-9* была обнаружена с помощью антител, загрязняющих антисыворотку к *Ly-2.1*, а также с помощью крысиных и мышиных моноклональных антител [2]. Антигены *Ly-9* высоко иммуногенны, и антитела к ним могут загрязнять многие сыворотки анти-*Ly*. При получении неконгенных антисывороток к *Ly-2.1* или *Ly-3.1* (также не имеющих ничего общего с *Ly-9*) две трети иммунизированных животных образуют антитела к *Ly-9* и только у четверти животных формируются антитела к *Ly-2* или *Ly-3* [28]. Этот пример иллюстрирует одну из наиболее существенных проблем, возникающих при получении антисывороток к антигенам *Ly*. Локус *Ly-9* имеет два аллеля: *Ly-9^a* и *Ly-9^b*. Он расположен в хромосоме 1 и сцеплен с локусом, участвующим в реакции смешанных лимфоцитов (РСЛ), локусом гистосовместимости (*H-25*) и генами *LyM-1* и *Ly-m20*, кодирующими другие поверхностные антигены лимфоцитов. Локус *Ly-5* также расположен в хромосоме 1. Таким образом, это еще один пример образования кластеров генов, отвечающих за реакции, протекающие на поверхности лимфоцитов (табл. 17.8). Антиген *Ly-9* обнаруживается более чем у 95% тимоцитов, Т-клеток и В-клеток, но только у 40% клеток костного мозга. Он отсутствует в почках, семенниках, легких, сперме, эпидермисе и эритроцитах. Моноклональные антитела к *Ly-9* адсорбируются мозгом и печенью. Этого, однако, не наблюдается при использовании обычных антисывороток; причина такого расхождения остается неясной. Специфичности *Ly-9* обнаруживаются на трипсин-чувствительном гликопротеине с мол. массой 100 кДа, содержащем много концевых остатков сиаловой кислоты. Моноклональные ксеноантитела в отличие от аллоантител преципитируют также молекулы тимоцитов с большей молекулярной массой. Проведенные в небольшом объеме исследования функциональных Т-клеток показали, что Т-хелперные и Т-супрессорные клетки, участвующие в образовании антител к фосфохолину (ФХ), содержали *Ly-9*. Более того, В-клетки, примированные ФХ, также имели фенотип *Ly-9⁺* [28].

17.3.1.10. *Ly-m10*

Обнаружение локуса *Ly-m10* — это прекрасный пример, иллюстрирующий огромные возможности моноклональных антител и недостатки использования конгенных мышей. Этот локус был описан с помощью моноклональных антител. Он тесно сцеплен с *Ly-1* [29] и был введен в конгенные по *Ly-1* линии при их выведении. В результате антисыворотки к *Ly-1.1*, полученные в конгенных линиях, почти наверняка содержат антитела к *Ly-m10*. Это имеет важное значение, поскольку антисыворотки к *Ly-1* широко используются в функциональных исследованиях Т-клеток. *Ly-m10* и *Ly-1* — это разные аллоантигены лимфоцитов, поскольку они имеют разное распределение по линиям (табл. 17.5) и различаются по распределению в тканях. Эти результаты показывают, что использование конгенных линий не может служить окончательным доказательством специфичности обычных антисывороток: при получении конгенной линии кластеры генов могут сегрегироваться вместе.

17.3.1.11. *Ly-11, Ly-12, Ly-13, Ly-14*

Множество антисывороток было получено при иммунизациях между линиями I29, C57L и родственными линиями. Эти антисыворотки выявляли на тимоцитах продукт гена *Ly-9* (см. выше) и *Ea-7*, который раньше считался специфичным для эритроцитов [30]. Кроме того, с их помощью были описаны следующие гены.

17.3.1.12. *Ly-11*

Этот ген не следует путать с *Ly-11* Меруло (разд. 17.3.1.7) и с *Ly-m11* Хаммерлинга (см. ниже). Были описаны два аллеля этого гена, кодирующие специфичности *Ly-11.1* и *Ly-11.2*, к обоим из которых были получены антисыворотки. Антиген *Ly-11* присутствует на всех тимоцитах и обнаружен также на клетках почки. Его детерминанты выявляются на молекуле с мол. массой 18—20 кДа.

17.3.1.13. *Ly-12*

Антиген *Ly-12* экспрессируется на большинстве тимоцитов и периферических лимфоцитов и не обнаруживается в других тканях. Была описана только одна его специфичность.

17.3.1.14. *Ly-13*

Антиген *Ly-13* имеется на большинстве тимоцитов, периферических лимфоцитов, а также в мозге, печени, почках и у эритроцитов. Известна только одна специфичность этого антигена.

17.3.1.15. *Ly-14*

Для локуса *Ly-14* описана только одна специфичность *Ly-14.2*. Этот локус сцеплен с локусом альбинизма (*c*) в хромосоме 7. Антиген *Ly-14* обнаруживается более чем на 90 % тимоцитов, на поверхности лимфоцитов селезенки и лимфатических узлов, а также в мозге, печени и почках. Молекула *Ly-14* имеет мол. массу 73 кДа.

17.3.1.16. *Ly-15*

Локус *Ly-15* был обнаружен с помощью обычных аллоантисывороток (выявляющих специфичность *Ly-15.1*), полученных при иммунизациях между рекомбинантными инбредными мышами СХВ Бэйли, а также с помощью моноклональных антител, узнающих специфичность *Ly-15.2*. У локуса *Ly-15* обнаружено два аллеля. Антиген *Ly-15* имеется более чем на 95 % тимоцитов, Т-клеток и В-клеток, а также клеток печени. Его нет, однако, в почках, мозге и на эритроцитах [2]. Хотя этот антиген широко распространен в организме, Т-клетки, содержащие *Ly-15*, можно подразделить на две популяции. В одной популяции все клетки имеют одинаковый низкий уровень экспрессии *Ly-15*, в другой — степень экспрессии этого антигена значительно варьирует. Выяснение роли этих двух популяций в иммунном ответе может оказаться весьма информативным. Специфичности *Ly-15* обнаруживаются на молекуле, имеющей вес более 150 кДа.

17.3.1.17. *Ly-m11*

Данный локус был обнаружен с помощью моноклонального антитела, полученного при слиянии клеток селезенки мышей SJL, иммунизированных клетками B10.S. Для локуса *Ly-m11* описана только одна специфичность (табл. 17.5). Ряд интересных наблюдений свидетельствует о том, что это антитело выявляет серологический полиморфизм молекулы β -2-микроглобулина. Во-первых, *Ly-m11* расположен в хромосоме 2 и сцеплен с локусами *H-3* и *Ly-4*, а также с геном, кодирующим электрофоретический полиморфизм β -2-микроглобулина (см. выше, в разд. 17.3.1.5). Во-вторых, как и β -2-микроглобулин, *Ly-m11* имеется в большинстве тканей, а не только на лимфоцитах. В-третьих, антитела к *Ly-m11*

преципитируют двухпочечную молекулу, состоящую из двух полипептидных цепей с мол.массой 45 и 12 кДа, причем компонент 12 кДа — это и есть β -2-микроглобулин [3]. Ксеногенные антисыворотки к β -2-микроглобулину преципитируют похожие двухцепочечные молекулы, легкая цепь которых (12 кДа) представляет собой β -2-микроглобулин, а тяжелая — молекулу класса I мышного комплекса H-2. В-четвертых, антиген *Ly-m11*, как и β -2-микроглобулин, обнаруживается в тканевых жидкостях. Таким образом, имеются убедительные, хотя и косвенные доказательства идентичности *Ly-m11* и β -2-микроглобулина. Ко времени написания этой книги их идентичность не была, однако, окончательно доказана.

17.3.1.18. *Ly-16*

Как и локус *Ly-9*, этот локус был обнаружен с помощью антител, загрязняющих обычные антисыворотки C57/BR-анти-CE. Антиген *Ly-16* отличается от других антигенов по распределению в инбредных линиях. Он представлен во всех линиях мышей, кроме C57/BR и C57L (табл. 17.5). Пока описана только одна специфичность *Ly-16.2*. Она имеется на тимоцитах, клетках лимфатических узлов, селезенки и мозга, но отсутствует в почках, печени и у эритроцитов [2].

17.3.1.19. *Ly-m18*

Этот локус был описан недавно с помощью моноклональных антител, выявляющих специфичность *Ly-18.2* [31]. Антиген обнаруживается на 90 % тимоцитов и на 50 % Т- и В-клеток. Распределение *Ly-m18* по линиям уникально. Локус *Ly-m18* сцеплен с локусом *Ltw-2*, но его хромосомная локализация пока не установлена.

17.3.1.20. *Ly-m19*

Этот локус обнаружен с помощью моноклональных антител, полученных против состоящей из пре-В-клеток опухоли 70Z/3 [32]. *Ly-m19* имеется только на 15 % тимоцитов, но среди Т- и В-лимфоцитов он обнаруживается на значительной части клеток: на 75 % клеток селезенки и лимфатических узлов и на 35 % клеток костного мозга. Локус *Ly-m19* сцеплен с *Lyb-2* и расположен в хромосоме 4 в еще одном кластере генов, кодирующих поверхностные антигены.

17.3.1.21. *Lna-1* (аллоантиген-1 лимфатических узлов)

Этот описанный недавно аллоантиген ([33]) представляет собой одну из наиболее интересных молекул клеточной поверхности из всех известных к настоящему времени. *Lna-1* был выявлен с помощью обычной аллоантисыворотки (BALB.I-H-2^j $\times$ SWR)_{F1}-анти-1:29 (В-клеточная опухолевая линия I). Данный антиген присутствует только в лимфатических узлах, а в селезенке, костном мозге и тимусе его нет. От 30 до 40 % Т- и В-клеток лимфатических узлов имеют фенотип *Lna-1*⁺. Наиболее интересное свойство этой антигенной системы заключается в том, что экспрессия *Lna-1* происходит только в присутствии селезенки (хотя клетки селезенки и не содержат *Lna-1*): клетки лимфатических узлов мышей +/Dh с наследственным отсутствием селезенки не имеют *Lna-1*. Интересно, что у этих мышей экспрессия *Lna-1* может быть индуцирована инкубацией их клеток с Кон А *in vitro*. Аналогично тимоциты и клетки селезенки, но не клетки костного мозга (все *Lna-1*⁻) нормальных мышей C57BL/6 также могут быть индуцированы в экспрессии *Lna-1* инкубацией с Кон А *in vitro*. Наконец, экспрессию *Lna-1* можно индуцировать у клеток селезенки инкубацией с барань-

ими эритроцитами как *in vivo*, так и *in vitro*. Эти наблюдения показывают, что система Lna-1 — динамичная аллоантигенная система, обладающая индуцибельностью и ограниченным распространением по лимфоидным органам. Кроме того, они показывают, что селезенка может контролировать перемещения лимфоцитов на периферии лимфоидной системы. Очевидно, что само существование этой антигенной системы открывает перед исследователями ряд крайне интересных перспектив.

17.3.2. Аллоантигены, специфичные для В-лимфоцитов

До сих пор мы обсуждали аллоантигены, экспрессирующиеся на Т-лимфоцитах или на Т- и В-лимфоцитах, обращая основное внимание на функциональные исследования Т-клеток. Описанные ниже шесть аллоантигенов *Lyb*, а также *Ly-17* и аллоантиген РС обнаружены только на В-лимфоцитах или на плазматических клетках. С их помощью было получено много полезных сведений

Таблица 17.10. Распределение антигенных локусов мышиных В-клеток по линиям¹⁾

	СВА/N	СВА J	BALB/c	C57BL/6	DBA/2	SJL
<i>Lyb-2</i>	2	1	2	2	1	3
<i>Lyb-3</i>	²⁾	?	+	+	H. O.?	H. O.?
<i>Lyb-4</i>	H. O.	1	—	—	1	—
<i>Lyb-5</i>	²⁾	2	2	2	1	2
<i>Lyb-6</i>	—	1	—	—	1	—
<i>Lyb-7</i>	²⁾	—	—	—	1	—
РС-1	H. O.	?	+	—	—	+
РС-2	+	+	+	+	+	+
<i>Ly-17</i>						
<i>Ly-m20</i> ³⁾	H. O.	2	2	2	2	1
<i>LyM-1</i> ³⁾	H. O.	2	2	2	2	2

¹⁾ Прочерк означает наличие лишь одной серологически выявляемой специфичности.

²⁾ У мышей СВА/N отсутствует та популяция В-лимфоцитов, которая экспрессирует *Lyb-3*, *Lyb-5* и *Lyb-7*.

³⁾ *Ly-17* и *Ly-m20* — это, по всей видимости, один и тот же локус.

о функциях В-лимфоцитов (табл. 17.4 и 17.10). Эти антитела следует рассматривать в одном ряду с другими антителами к В-клеткам, такими, как антитела к Ia, описанные в гл. 13.

17.3.2.1. *Lyb-2*

Этот локус был идентифицирован как с помощью обычных антисывороток, так и с помощью моноклональных антител. В отличие от большинства описанных выше локусов *Ly* он имеет три аллеля, кодирующие специфичности *Lyb-2.1*, *Lyb-2.2* и *Lyb-2.3*. Локус *Lyb-2* расположен в хромосоме 4 и сцеплен с *Lyb-4*, *Lyb-6*, *Lyb-m19* и геном рецептора ЛПС, образуя очередной кластер генов клеточной поверхности, сцепленный с локусом фосфоглукотоматаза-2 [3]. Его специфичности имеются на В-клетках и на 40% клеток костного мозга и отсутствуют у Т-клеток и тимоцитов. Высокий уровень реакции с костным мозгом показывает, что помимо зрелых В-клеток с фенотипом Ig⁺ существуют и другие клетки *Lyb-2*⁺ — возможно, это предшественники В-лимфоцитов. Раньше пред-

полагалось, что клетки, образующие IgG-бляшки (БОК), имеют фенотип Lyb-2⁺ [34]. Однако при использовании моноклональных антител к Lyb-2.1 выяснилось, что БОК, специфичные к бараньим эритроцитам (БЭ, SRBC), не имеют Lyb-2 [35]. Лизис клеток, образующих IgG-бляшки, обычными антисыворотками к Lyb-2 связан с побочными антителами, а не с антителами к Lyb-2. Таким образом, при использовании в эксперименте неконгенных животных следует с большой осторожностью относиться к данным о наличии Lyb-2 на определенных функциональных В-лимфоцитах.

По всей видимости, предшественники В-лимфоцитов и клонируемые В-лимфоциты имеют фенотип Lyb-2⁺, так же как и клетки, реагирующие на ТНФ-БЭ (тимусзависимый антиген), а В-лимфоциты, реагирующие на тимуснезависимый антиген ТНФ-*Brucella abortus*, имеют фенотип Lyb-2⁻. Интересно, что молекулы Lyb-2 могут непосредственно участвовать в формировании клеток, образующих антитела к БЭ: добавление в культуральную среду моноклональных антител к Lyb-2.1 предотвращает реакцию на БЭ *in vitro* и в то же время никак не влияет на реакцию, направленную против ТНФ-*Brucella abortus* или ТНФ-фикола [36]. Считается, что молекула Lyb-2 построена из одной цепи с мол.массой 45 кДа [34].

17.3.2.2. CBA/N и мутация *xid*

Интерес к линии CBA/N возник после того, как было замечено, что эти мыши не отвечают на полисахарид пневмококка. Это оказалось связано с присутствием у них гена *xid*, сцепленного с X-хромосомой и отвечающего за целый ряд эффектов в той части иммунного ответа, которая обуславливается В-лимфоцитами [1, 34]. К этим эффектам относятся уменьшение числа В-лимфоцитов, сходство В-лимфоцитов взрослых мышей CBA/N с В-лимфоцитами нормальных новорожденных мышей, нарушенная реакция на тимуснезависимые антигены, неспособность к реакции смешанных лимфоцитов (РСЛ), возникающей в ответ на различие по локусу *Mls*, и, наконец, отсутствие клеток, несущих антигены Lyb-3, Lyb-5 и Lyb-7. По всей видимости, ген *xid* контролирует образование уникальной субпопуляции В-лимфоцитов с фенотипом Lyb-3⁺, Lyb-5⁺, Lyb-7⁺, т.е. линия CBA/N имеет врожденный дефект процесса дифференцировки В-лимфоцитов. Поскольку это рецессивный дефект, сцепленный с X-хромосомой, то он проявляется у гомозиготных самцов и самок CBA/N, а также у самцов гибридов F₁ в том случае, если мать принадлежит к линии CBA/N.

17.3.2.3. Lyb-3

Этот локус был обнаружен с помощью антител, полученных при иммунизации самцов F₁ (CBA/N × BALB/c), несущих описанный выше дефект, клетками селезенки мышей BALB/c. Все линии мышей, за исключением CBA/N, имеют локус *Lyb-3*. Антиген Lyb-3 был обнаружен примерно у 50% В-клеток, но не у тимоцитов, Т-клеток и клеток костного мозга. Количество Lyb-3 зависит от возраста мыши: при рождении его нет совсем, а в возрасте 15 недель его экспрессия достигает максимума. Введение антител к Lyb-3 *in vivo* приводит к значительному увеличению (в 20 раз) антительного ответа на БЭ. Для этого требуется присутствие антигена, а введение антител может отчасти заменять помощь Т-клеток [34]. Наиболее интересная возможность заключается в том, что молекула Lyb-3 участвует в передаче второго, возможно усиливающего, сигнала при антигензависимой активации В-клеток [34, 37, 38]. Молекула Lyb-3 имеет мол. массу 68 кДа, и, несмотря на сходство в размере с тяжелой цепью Ig, она отличается от мембранного Ig в антигенном отношении [37].

17.3.2.4. *Lyb-4*

Эта специфичность была обнаружена с помощью обычной цитотоксичной антисыворотки C57BL/6Ks-анти-L1210 (лимфома мышей DBA/2). Антиген присутствует на В-клетках, но не на тимоцитах, Т-клетках и большинстве клеток костного мозга [38]. По данным функциональных исследований антитела к *Lyb-4* подавляют РСЛ, вызываемую различиями по *H-2* и *Mls*, в том случае, если стимулирующие клетки гомозиготны или гетерозиготны по *Lyb-4.1*. Цитотоксичная активность антисыворотки к *Lyb-4.1* и способность подавлять РСЛ сегрегируются при возвратных скрещиваниях совместно. Поэтому маловероятно, что эти два феномена вызываются двумя различными типами антител, присутствующих в антисыворотке. Лocus *Lyb-4* картируется в хромосоме 4 и сцеплен с локусами *Lyb-2*, *Lyb-6* и *Lyb-m19*. Считается, что он кодирует молекулу 45 кДа, но это может быть ошибкой, вызванной загрязняющими антителами к *Lyb-6* [3, 34].

17.3.2.5. *Lyb-5*

Антиген *Lyb-5* появляется на поздних стадиях созревания В-лимфоцитов. Он был обнаружен с помощью антисыворотки, полученной при иммунизации мышей C57BL/6 клетками DBA/2 и затем истощенной клетками тимуса и селезенки самцов F_1 (CBA/N $\times$ DBA/2) с дефектом В-лимфоцитов. В результате этого изыщного серологического подхода были получены антитела к *Lyb-5.1*, выявляющие популяцию В-лимфоцитов, которых нет у мышей CBA/N [39]. Противоположная специфичность *Lyb-5.2* была обнаружена таким же образом с помощью антисыворотки, полученной у мышей DBA/2, иммунизированных клетками C57BL/6, и истощенной клетками самцов F_1 (CBA/N $\times$ C57BL/6) [34]. Специфичности *Lyb-5* не появляются до 14-го дня жизни мыши и экспрессируются на 60% В-лимфоцитов, 70% которых несет рецептор комплемента. Это еще раз показывает, что клетки *Lyb-5⁺* относятся к В-лимфоцитам на поздних стадиях созревания. В пользу такого вывода говорит и тот факт, что В-лимфоциты, остающиеся после обработки антисывороткой к *Lyb-5.1* и комплементом, имеют те же функциональные нарушения, что и клетки CBA/N. Недавно было показано, что клетки *Lyb-5⁺* необходимы для образования антител к тем антигенам, которые презентуются макрофагами, — пример дифференцированного вовлечения В-клеточной субпопуляции в иммунный ответ [34].

17.3.2.6. *Lyb-6*

Для обнаружения аллоантигенной системы *Lyb-6* были применены методы иммунопреципитации с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Антисыворотка CBA/N-анти-CBA/J преципитировала молекулы 45 кДа, образующие обычно димер 90 кДа, который можно диссоциировать восстановлением с помощью 2-меркаптоэтанола в присутствии мочевины. Антиген *Lyb-6* имеется на клетках, несущих Ig. Его нет у В-клеток без поверхностных Ig, клеток костного мозга и тимоцитов [40]. Была описана только одна специфичность этого антигена. Лocus *Lyb-6* расположен в хромосоме 4 и сцеплен с локусами *Lyb-2*, *Lyb-4* и *Ly-m19*. Возможность получения антител к *Lyb-6* у мышей CBA/N не связана с геном *xid*, а просто отражает аллельные различия между мышами CBA/N и CBA/J. Об этом говорят два обстоятельства: во-первых, самцы F_1 (CBA/N $\times$ DBA/2) имеют фенотип *Lyb-6.1⁺* (мыши DBA/2 также *Lyb-6.1⁺*), а во-вторых, антитела к *Lyb-*

6.1 могут загрязнять антисыворотки к LyM.1 (СЗН/HeJ-анти-СВА/J). Антиген появляется впервые на первой неделе жизни, и его экспрессия достигает максимума на 4-й или 5-й неделе [41].

17.3.2.7. *Lyb-7*

Антисыворотки к *Lyb-5* подавляют образование *in vitro* антител к ТНФ-фиколу и родственным антигенам, но не к ТНФ-*Brucella abortis* [34]. Возвратное скрещивание (С57BL/6 и DBA/2) × DBA/2 показало, что цитотоксическая активность антисыворотки к *Lyb-5* сегрегируется независимо от активности, подавляющей образование антител. Был сделан вывод, что подавляющая активность связана с новым локусом *Lyb-7*. Кроме того, истощение антисыворотки клетками селезенки мышей AL/N удаляет цитотоксические антитела (анти-*Lyb-5.1*), но оставляет подавляющие антитела (анти-*Lyb-7.1*), т.е. мыши AL/N имеют фенотип *Lyb-5.1*⁺*Lyb-7.1*⁻. Это единственная независимо полученная линия, различающая эти антигены [42]. Исследование рекомбинантных инбредных мышей BXD и BXH и мышей, полученных в результате соответствующего возвратного скрещивания, показало, что локус *Lyb-7* не сцеплен с *Lyb-5*, но слабо сцеплен с локусом *Igh* [42] и расположен в хромосоме 12. У мышей СВА/N *Lyb-7* отсутствует так же, как и *Lyb-3* и *Lyb-5* [42].

Очевидно, что антигены *Lyb* — это наиболее интересный набор молекул, в частности потому, что *Lyb-2*, *Lyb-3*, *Lyb-4* и *Lyb-7*, по всей видимости, непосредственно участвуют в некоторых функциях В-лимфоцитов.

17.3.2.8. *Lyb-17*, *Ly-m20*

Аллоантиген *Ly-17.1* — это один из немногих маркеров, специфичных только для В-лимфоцитов. Его специфичность была обнаружена с помощью обычной аллоантисыворотки, но ни о каких функциональных или биохимических исследованиях не сообщалось [43]. Аллоантиген *Ly-m20.2*, обнаруженный с помощью моноклональных антител, по всей видимости, представляет собой детерминанту, прямо противоположную *Ly-17.1* (его название следует, возможно, изменить на *Ly-17.2*). Об этом говорят противоположный (по сравнению с *Ly-17.1*) характер его распределения по линиям и идентичное распределение по тканям. Локус *Ly-m20* обнаруживается в хромосоме 1 и сцеплен с локусами *Ly-9* и *Mls* (см. выше о *Ly-9*). Показано также, что клетки, образующие IgM-антитела, содержат *Ly-m20* [44].

17.3.2.9. Антигены плазматических клеток PC-1, PC-2

Известно несколько антигенов, экспрессируемых на поверхности и плазматических клеток, и лимфоцитов (например, *Ly-17*; см. выше). PC-1 и PC-2, однако, в ряду лимфоидных клеток обнаружены только у плазматических клеток. PC-1, кодируемый локусом *Pca-1*, был обнаружен с помощью обычной антисыворотки DBA/2-анти-MOPC-70A (миелома мышей BALB/c). Эти антитела токсичны для большинства плазматом и клеток, образующих антитела класса IgM и IgG, но не для предшественников В-клеток, т.е. они являются маркером поздних стадий В-клеточной дифференцировки. Антиген PC-1 обнаружен также на клетках мозга, почек и печени [45]. Наиболее интересное наблюдение, касающееся PC-1, состоит в следующем: у линий с фенотипом PC-1⁻ могут быть индуцированы миеломы с фенотипом PC-1⁺. Очевидно, у этих линий имеются латентные гены *Pca-1* — нечто сходное с латентными вирусами. Действительно, было

высказано предположение, что РС-1 — это ассоциированный с вирусом антиген. Однако ввиду его высокой молекулярной массы (110 кДа) маловероятно, что он представляет собой структурный антиген вириона, хотя его экспрессия и может быть связана с функцией вируса. РС-2 был обнаружен с помощью моноклональных антител [46]. В отличие от РС-1 он имеется у всех линий мышей и обнаруживается только на плазматических клетках. Антисыворотки к РС-1, по всей видимости, содержат и антитела к РС-2.

17.3.2.10. *LyM-1*

Линии СВА/J и СЗН/HeJ идентичны по *H-2* и родственны между собой. Однако кожные трансплантаты между ними отторгаются, а лимфоциты дают сильную РСЛ [1]. Детерминанта, стимулирующая РСЛ, была картирована в локусе *Mls*, который располагается в хромосоме 1 [34, 47] и сцеплен с локусами *Ly-9* и *H-25* (см. выше). Иммунизация мышей СЗН/HeJ клетками селезенки мышей СВА/J вызывает образование обладающих небольшой цитотоксичностью антител, определяющих локус *LyM-1* (с тремя аллелями), также очень тесно сцепленный с *Mls* [48]. Тем не менее это два разных локуса, поскольку а) в специальных исследованиях удалось получить рекомбинации между ними и б) способность стимулировать РСЛ не зависит от аллелей *LyM-1*, т.е. у мышей, идентичных по *LyM-1*, может наблюдаться сильная РСЛ [34]. Слабые антитела к *LyM-1.2* выявляют 70% клеток селезенки, 30% клеток лимфатических узлов и 75% клеток костного мозга. Активность антисыворотки направлена преимущественно против В-лимфоцитов и фагоцитов. Антисыворотка к *LyM-1.2* и комплемент избирательно подавляют функции В-лимфоцитов. Интересно, что антитела к *LyM-1.2* специфически подавляют связывание Ig через Fc-фрагмент, причем эта их активность сегрегируется вместе с локусом *LyM-1*, но не с локусом *Mls*, еще раз подтверждая, что эти два локуса не идентичны.

Степень экспрессии *LyM-1* может достигать трех различных значений, причем интересно, что уровень экспрессии этого антигена зависит от аллеля *Mls*. У мышей с аллелями *Mls^a* и *Mls^d* антитела к *LyM-1* лизируют 70% клеток селезенки, у мышей с аллелем *Mls^b* — 50%, а у мышей с аллелем *Mls^c* — только 20%. Невысокая активность обычных антител создает существенные трудности при анализе этой интересной системы. Поэтому важное значение будет иметь получение моноклональных антител к *LyM-1*.

17.4 Прочие антигены лимфоцитов

В этом разделе будут рассмотрены антигены, которые не укладываются в рассмотренную выше классификацию. Это сцепленные с полом или ассоциированные с полом антигены, антигены, выявляемые ксеногенными антисыворотками, и антигены, ассоциированные с вирусом лейкемии мышей. Антигенам других тканей, экспрессия которых на поверхности лимфоцитов представляет лишь вторичный интерес, посвящен отдельный обзор [1]. К ним мы относим F-антигены, антигены *Mph-1* или *Mac-1* (макрофаги), *Sk-1* и *Sk-2* (кожа).

17.4.1. H-Y

Чтобы объяснить способность мышей-самок отторгать трансплантаты тканей сингенных самцов, было высказано предположение о существовании специфичного для самцов антигена тканевой совместимости H-Y [49]. H-Y был обна-

ружен в сперме, коже, репродуктивных тканях самцов, у восьмиклеточных эмбрионов мужского пола и на поверхности лимфоцитов [50]. Позднее научились определять антиген Н-У серологически, с помощью антисыворотки против самцов C57BL/6, полученной у самок C57BL/6. Следует, однако, заметить, что такие антисыворотки очень трудно получать: их титр низок, а антитела трудно обнаруживать. Данные о специфичности антисывороток к Н-У и эффективности существующих серологических методов при их определении противоречивы. Сейчас, однако, появились сообщения о моноклональных антителах к Н-У, выявляющих этот антиген на соответствующих клетках и способных подавлять литическую реакцию клеток на лимфоциты, направленную против Н-У [3]. По имеющимся данным антиген Н-У — это гликопротеин с мол.массой 18 кДа. Наличие антител к Н-У может сыграть важную экономическую и социальную роль, поскольку позволит разделять сперматозоиды или эмбрионы, несущие Н-У (будущие самцы) от не несущих Н-У (будущие самки). Функция Н-У на поверхности лимфоцитов пока неизвестна.

17.4.2. Ly-X

Эта интересная и новая система была обнаружена в одной лаборатории [51]. При ее получении руководствовались недоказанным предположением, что клетки линий, дающих слабый антительный ответ, лишены каких-то молекул клеточной поверхности, имеющих у высокореактивных линий. У низкореактивных мышей были получены сыворотки против высокореактивных мышей. В качестве антигенов для определения реактивности использовали полисахарид пневмококка типа 3, poly(I)-poly(C) или денатурированную ДНК. Было известно, что у нескольких линий (SJL, BALB/c и DBA/2) низкая реактивность сцеплена с X-хромосомой. Поэтому мы иммунизировали низкореактивных гибридных самцов F₁ клетками высокореактивных гибридных самок F₁.

Сыворотки оказались многокомпонентными, но с их помощью удалось определить три специфичности: LyX-1, LyX-2 и LyX-3. Эти антигены имеются примерно у 25% Т-клеток, не прикрепляющихся к нейлоновой вате, 8% клеток тимуса и 10% клеток селезенки и лимфатических узлов. Дальнейшие исследования показали, что антисыворотки против LyX-2, а возможно, и другие антисыворотки к LyX, содержат два типа антител, один из которых направлен к Т-клеточному антигену, а другой — к В-клеточному антигену. Из этих исследований вытекает возможность того, что иммунная реактивность определяется свойствами клеточной мембраны, а это представляется чрезвычайно важным.

17.4.3. Антигены природных киллеров

Природные киллеры (ПК, NK) экспрессируют специфический набор антигенов клеточной мембраны. У мышей это Ly-5 (T-200), который, видимо, имеет отношение к рецептору природных киллеров, а также Qa-4 и Qa-5. Эти антигены обнаруживаются также на лимфоцитах, но природные киллеры имеют и уникальные антигены — NK-антигены. Специфичность NK-1.1 присутствует в виде примесей в антисыворотке к Ly-1.2 (C3H-анти-CE), но ее можно получить и специально, если иммунизировать (C3H × BALB/c)F₁ клетками CE. Были описаны и другие специфичности NK [52]. Кроме этих антигенов, которые экспрессируются большинством природных киллеров, часть данных клеток экспрессирует также Ly-1.1, Thy-1.2 и Qa-2.

17.4.4. Ксеноантигены

Антигены этого типа выявляют с помощью двух подходов: а) обычными кроличьими или козьими антисыворотками против мышинных клеток или б) крысиными моноклональными антителами против мышинных клеток. Несмотря на трудность получения ксеноантисывороток к антигенам мышинных лимфоцитов, в небольшом количестве их все же удалось получить. Оказалось, что они являются очень важными реагентами. Этим антигенам посвящено несколько обзоров [1, 2, 34], поэтому здесь мы их рассмотрим очень бегло.

Антилимфоцитарная сыворотка (АЛС, ALS) до сих пор остается наиболее сильным серологическим иммуносупрессивным реагентом. Она содержит множество специфичностей, наиболее важной из которых являются антитела к Т-клеткам, ответственные за удаление *in vivo* Т-клеток и вызванный этим иммуносупрессивный эффект. Поверхностный антиген мышинных Т-лимфоцитов (MTLA, MTLA) имеется у тимоцитов, Т-клеток и, возможно, соответствует молекуле Thy-1.2. Эта антисыворотка была использована для разделения Т-лимфоцитов на три класса в соответствии с их ультраструктурой. Антисыворотки к специфическому антигену мышинных лимфоцитов (CAMI, MSLA), присутствующему на тимоцитах и лимфоцитах, также обладают иммуносупрессорным действием при введении в организм. В результате иммунизации кроликов гомогенизированной тканью мозга была получена антисыворотка к ассоциированному с мозгом антигену тэта (Baθ). Эта антисыворотка специфична к Т-клеткам. Кроме того, она удаляет колониеобразующие клетки в селезенке. Не исключено, что все эти антисыворотки узнают один и тот же антиген.

Антиген периферических лимфоцитов мыши (АПЛМ, MPLA) имеется у 100% клеток лимфатических узлов и только у 4% тимоцитов. К цитотоксичной субпопуляции клеток были получены и другие ксеноантисыворотки. Они реагируют с антигеном Ka и антигеном киллерных Т-клеток мыши (МКТКА, МКТСА). Система антигенов ThB (см. также разд. 17.3.1.7) была обнаружена с помощью антисывороток, полученных у кроликов и коз, иммунизированных клетками миеломы МОРС-104Е линии BALB/с. Этот антиген присутствует на поверхности только 50% тимоцитов и В-лимфоцитов, но его совсем нет у периферических Т-клеток. К антигенам В-лимфоцитов также были получены ксеноантисыворотки. Сюда относится антиген, специфичный для лимфоцитов костного мозга мыши (МКЛА, MBLA), который находится на поверхности В-лимфоцитов, и антиген, специфичный для плазматических клеток мыши (МСПКА, MSPCA), который располагается на тех же клетках, что и PC-1.

Трудности, связанные с приготовлением таких антисывороток, были частично преодолены получением крысиных антимышинных моноклональных антител. Такие антитела были получены против мономорфных детерминант молекул Ly-1, Ly-2, Ly-5 и полиморфной детерминанты Ly-9 [2, 52]. Наконец недавно моноклональные ксеноантитела были использованы для разделения популяций В-лимфоцитов, особенно тех, которые находятся на ранних стадиях дифференцировки [53]. Хотя здесь мы рассмотрели ксеноантисыворотки очень кратко, они играют важную роль в иммунологии: во-первых, они обладают высокой активностью *in vivo*, а во-вторых, узнают не только полиморфные, но и мономорфные антигены и могут быть поэтому использованы со всеми линиями мышей.

17.4.5. Аллоантигены лимфоцитов

Одну из основных групп поверхностных антигенов лимфоцитов мыши составляют структурные и ассоциированные антигены названного вируса. Все линии мышей заражены этим вирусом, но степень его экспрессии варьирует от линии

к линии [1, 54]. Повсеместное распространение вируса мышинной лейкемии влечет за собой несколько важных последствий. Во-первых, у всех линий мышей циркулируют в крови антитела к вирусу, способные связываться с опухолевыми клетками или клетками, экспрессирующими большое количество вирусных антигенов, и в присутствии комплемента лизировать их [1, 55]. Поэтому литическое действие антисыворотки может быть связано не со специфическими антителами, а с антителами против вируса, так как наличие таких антител может приводить к ошибкам в типировании сывороток [54]. Во-вторых, имеется несколько аллоантигенных систем, которые являются частью вирусных антигенов: GIX, GSA, GCSA, а, возможно, также GRADA-1 и GERLD. Считается также, что к антигенам, ассоциированным с ВМЛ, относятся X-1 и PC-1 [1].

Очевидно, что часть набора аллоантигенов поверхности лимфоцитов составляют антигены ВМЛ. Однако ни одно из проверенных антител к Lu не связывается со структурными белками данного вируса [56].

17.5 Функциональные исследования

Одним из наиболее важных открытий клеточной иммунологии за последние 10 лет стало наблюдение Кантора и Бойза (Cantor, Boyse), заметивших, что антигены Lu-1 и Lu-2/3 по-разному экспрессируются на разных функциональных субпопуляциях Т-лимфоцитов [8, 9]. Согласно их данным и данным из других лабораторий, цитотоксические Т-клетки имеют фенотип Lu-1⁻2/3⁺, хелперные Т-клетки — фенотип Lu-1⁺2/3⁻, а супрессорные Т-клетки — Lu-1⁻2/3⁺ [8, 9, 57, 58]. После этих работ экспрессия Lu-1 и Lu-2/3 в функциональных субпопуляциях исследовалась во множестве экспериментальных систем (табл. 17.7; гл. 3, 4, 18, 25, 26; см. также [1]). Хотя аллоантигенов Lu описано много, лишь небольшая их часть была проверена на способность маркировать функциональные субпопуляции Т-лимфоцитов. Здесь мы лишь вкратце рассмотрим результаты функциональных исследований (табл. 17.7), а заинтересованному читателю посоветуем познакомиться с приведенным в этой главе описанием индивидуальных антигенов, а также прочесть цитируемые здесь оригинальные работы и более ранние обзоры [1, 2, 8, 9, 59].

Прежде чем перейти к обсуждению фенотипа Lu функциональных Т-клеток, следует остановиться на некоторых методических вопросах. Обычно для определения степени экспрессии антигена у функциональных клеток используют следующий метод. Клеточную популяцию обрабатывают антителами и комплементом и затем определяют функциональную активность оставшихся клеток. Потеря исследуемой активности в обработанных клетках, по-видимому, говорит о том, что эти функции осуществлялись клетками, несущими антиген и лизированными при добавлении антител и комплемента. Хотя этот метод наиболее часто используется и в большинстве случаев дает воспроизводимые результаты, он имеет и ряд недостатков. Во-первых, в ранних работах такого рода использовались обычные антисыворотки, содержащие антитела к вирусам, аутоантитела, иногда антитела к другим антигенам Lu. Наблюдавшиеся эффекты могли быть вызваны именно этими загрязняющими антителами. Использование моноклональных антител позволило решить эту проблему. Во-вторых, удаляемая с помощью антител популяция клеток может содержать не эффекторные, а вспомогательные клетки, и выяснить это часто бывает непросто. В-третьих, для лизиса клеток с помощью комплемента количество антигена на них должно быть выше некоего критического минимума. Клетки, имеющие небольшое, хотя

и выявляемое количество антигена, могут избежать лизиса, и тогда будет казаться, что они совсем не имеют антигена, хотя на деле он есть, но его просто очень мало. В-четвертых, различия в активности разных препаратов антител могут приводить к ошибочным результатам — и, следовательно, эту проблему можно решить с помощью моноклональных антител, поскольку эти антитела гомогенны и их можно получить в больших количествах. Наконец, в-пятых, чтобы быть уверенным в правильности результатов, полученных этим методом, следует использовать методы положительной селекции, т.е. выделять популяцию клеток, реагирующих с антителами, определять их функцию, а затем с их помощью восстанавливать функциональные свойства популяции, у которой содержащие антиген клетки были удалены. С учетом всех этих обстоятельств можно построить следующую общую классификацию Т-клеток.

17.5.1. Хелперные Т-клетки (T_H , T_h)

Во всех экспериментальных системах образования антител в ответ на бараны эритроциты и гаптены хелперные Т-клетки имеют фенотип $Ly-1^{+}2/3^{-}$. Предшественники хелперов также содержат $Ly-1$ [8, 58, 60]. Т-хелперные клетки могут быть подразделены на T_h-1 ($Ly-1^{+}1J^{-}$) и T_h-2 ($Ly-1^{+}1J^{+}$), которые действуют синергично. Хелперные клетки, участвующие в образовании цитотоксических Т-клеток, тоже имеют фенотип $Ly-1^{+}2/3^{-}$. Они содержат также $Ly-6$ и $Ly-7$, в то время как у их предшественников $Ly-7$ отсутствует [2].

17.5.2. Клетки гиперчувствительности замедленного типа ($T_{ГЗТ}$)

Во всех известных системах $T_{ГЗТ}$ имеют фенотип $Ly-1^{+}2^{-}$ (табл. 17.7). Кроме того, они содержат $Ly-5$. Клетки $Ly-1^{+}2/3^{-}$ способны также синтезировать лимфокины. Т-лимфоциты, супрессирующие ГЗТ, возникающую в ответ на эритроциты лошади, имеют фенотип $Ly-1^{+}2^{-}5^{+}6^{+}$ [2, 61].

17.5.3. Клетки, участвующие в отторжении трансплантата ($T_{от}$, T_{Gr})

Как и клетки T_H и $T_{ГЗТ}$, клетки $T_{от}$ имеют фенотип $Ly-1^{+}2/3^{-}$ [2, 62]. Этот результат был получен в следующих опытах. Клетки, обработанные антисывороткой, вводили тимэктомизированным и облученным мышам (реципиентам), затем определяли способность мышей отторгать трансплантаты. Те мыши, которым вводили клетки $Ly-1^{+}2/3^{-}$, отторгали трансплантат, а те, которым вводили клетки $Ly-1^{-}2/3^{+}$, — нет. Более того, мыши, получившие клетки $Ly-1^{+}2/3^{-}$, не имели цитотоксических Т-клеток ($Ly-1^{+}2/3^{+}$; см. ниже) [62]. Отсюда был сделан вывод, что в отторжении трансплантата цитотоксические Т-клетки не участвуют. Имеются данные о том, что $T_{от}$ более родственны клеткам $T_{ГЗТ}$ [63]. Показано, что клетки $T_{от}$ содержат антиген $Ly-5$ [62].

Сходство фенотипа Ly описанных трех типов клеток дает основание думать, что хелперная функция Т-клеток, отторжение трансплантата и гиперчувствительность замедленного типа осуществляются одними и теми же клетками. Так ли это или нет, пока еще не известно. Решение этого вопроса, по-видимому, значительно облегчилось бы, если бы были получены антитела, различающие эти клеточные популяции.

17.5.4. Цитотоксические Т-клетки (Тс)

Фенотип Ly ($Ly-1$, $Ly-2/3$) цитотоксических Т-клеток значительно варьирует в зависимости от иммунизирующего антигена. При первичной реакции на аллогенные клетки Тс имеют фенотип $Ly-1^{+}2/3^{+}5^{+}6^{+}7^{-}$, а при вторичной реакции — $Ly-1^{-}2/3^{+}$. Такой же фенотип имеют Тс против антигена Н-У и клеток, зараженных вирусом. $Ly-6$ экспрессируется на поверхности Тс против аллогенных клеток, но его нет у их предшественников [1, 2] (табл. 17.7).

17.5.5. Супрессорные Т-клетки (Тс)

Как в реакции образования антител, так и при формировании Тс супрессорные клетки, за редким исключением, имеют фенотип $Ly-1^{-}2/3^{+}$ (табл. 17.7). При образовании Тс клетки Тс имеют также антиген $Ly-6$, но не $Ly-7$. Как указывалось выше, ГЗТ супрессируется клетками $Ly-1^{+}2/3^{-}$, а реакция трансплантата против хозяина — клетками $Ly-1^{+}2/3^{+}$ [1, 2, 64] (табл. 17.10). Фенотип IJ этих клеток рассматривается в гл. 18.

17.5.6. Регуляторные Т-клетки

Недавние работы о природе Т-клеток, регулирующих иммунные реакции, продемонстрировали существование сложных регуляторных циклов [65, 66]. В них участвуют три типа клеток: с фенотипом $Ly-1^{+}2/3^{-}$, $Ly-1^{+}2/3^{+}$ и $Ly-1^{-}2/3^{+}$. Клетки $Ly-1^{+}2/3^{-}$ (сходные с Th) не только предоставляют помощь и усиливают иммунные реакции, но также супрессируют их в результате индукции клеток Тс, имеющих фенотип $Ly-2/3^{+}Qa-1^{+}IJ^{+}$. Клетки $Ly-1^{+}2/3^{-}$, индуцирующие супрессию, имеют также антиген $Qa-1$; для индуцирования супрессии они должны взаимодействовать с клетками $Ly-1^{+}2/3^{+}IJ^{+}$ [67]. Выявление этих межклеточных взаимодействий в той части иммунного ответа, которая осуществляется Т-клетками, представляет собой сложный пример использования антител к антигенам Ly . Подобные регуляторные механизмы более подробно рассматриваются в гл. 4 и в специальном обзоре [65].

17.5.7. Реакции Т-клеток на митогены

Клетки, реагирующие на Т-клеточные митогены ФГА или Кон А, имеют фенотип $Ly-1^{+}2/3^{+}5^{+}6^{+}Qa-2^{+}Qa-3^{+}$. Их, однако, можно различить по наличию антигена $Ly-7$: он есть у клеток, реагирующих на Кон А, но его нет у клеток, реагирующих на ФГА [2].

По сравнению с обилием информации о Т-клеточных популяциях, обобщенном в табл. 17.11, мы крайне мало знаем о популяциях В-клеток. $Lyb-2$ экспрессируется всеми В-клетками, а $Lyb-3, 4, 5, 6$ и 7 обнаруживаются у многих В-клеток (40—60%). Природа этих антигенов пока еще изучена плохо, но вполне возможно, что они играют непосредственную роль в антигенной активации, а следовательно, и в функционировании клеток (например, $Lyb-2$, 3 и 4). Антигены РС-1 и РС-2 маркируют конечные стадии дифференцировки В-клеток. Были получены моноклональные антитела к В-клеткам на ранней стадии дифференцировки [53]. В ближайшем будущем подразделение В-клеток на субпопуляции может стать не менее подробным, чем в случае функциональных Т-клеток.

Таблица 17.11. Функции Т-клеток Ly-1⁺, Ly-2/3⁺ и Ly-123⁺ в иммунитете (по [1—3])

Ly1 (Ly = 1⁺2⁺3⁻)

Т-клеточная помощь при образовании антител и Тс
Инициация ГЗТ
Выделение лимфокинов
Отторжение кожных и опухолевых аллотрансплантатов
Супрессия ГЗТ
Индукция супрессии по типу обратной связи
Пролиферация в РЛС в ответ на различие по области I

Ly23 (Ly = 1⁻2⁺3⁺)

Т-клеточная супрессия гуморальных реакций (антиген-специфических и не-специфических) и образования Тс
Уничтожение зараженных вирусом клеток цитотоксическими Т-клетками
Вторичная реакция цитотоксических Т-клеток на аллогенные клетки

Ly123 (Ly = 1⁺2⁺3⁺)

Первичная реакция цитотоксических Т-клеток на аллогенные клетки
Уничтожение сингенных опухолей
Мишень для действия индукторов Тс
Супрессия образования Тс на аллогенные клетки
Предшественник двух других популяций?

17.6. Субпопуляции лимфоцитов у человека

Одним из наиболее волнующих достижений иммунологии последних лет стала возможность выявления субпопуляций лимфоцитов у человека. Получены ксеногенные сыворотки против Т-клеток, которые были использованы для отделения Т-клеток от В-клеток, а также в качестве антилимфоцитарных сывороток для лечения больных. Однако только введение в практику моноклональных антител позволило достаточно подробно охарактеризовать клеточные субпопуляции (табл. 17.12). Описано множество антител к Т-клеткам. Часть этих антител приводится в табл. 17.12, остальные рассматриваются в других работах [68—71]. Интересно, что некоторые описанные независимо антитела выявляли одну и ту же антигенную детерминанту. Из анализа антител к Т-клеткам можно сделать несколько выводов.

Таблица 17.12. Выявление субпопуляций Т-клеток человека с помощью моноклональных антител (по [68—73])

Антитела	Реакция с		Мол. масса	Функция
	клетками тимуса (%)	периферическими Т-клетками (%)		
ОКТ-4; 9.3; Leu-3 3A1	40—100	50—70	40—62 кДа	Т-хелперы
ОКТ-5/8; Leu-2	50—80	20—35	35 кДа	Цитотоксические Т-клетки, Т-супрессоры
ОКТ-3; UCHL-1	20—50	100	19 кДа	Все Т-клетки, митогенная секреция интерферона
10-2; T101; L17F12	65—100	100	65 кДа	Т-клетки человека и В-CLL
Leu-1; ОКТ-1; A-50 9.6; Leu-5; ATM-3; ОКТ-11; HuLy-m1	100	100	48 кДа	Рецептор эритроцитарных розеток
ОКТ-6; NA1/34	85	0	49 кДа	Эквивалент T1a у человека?
ОКТ-9; 5E9	10	0—5	100 кДа	Рецептор трансферрина (у быстроделющихся клеток)

1. ОКТ-4 и сходные антитела (табл. 17.12) выявляют антиген, расположенный на Т-хелперах. Популяция клеток, выявляемая этими антителами, сходна с популяцией $Ly-1+2^-$ у мышей как по распределению в тканях, так и по наличию Т-хелперной активности [72].

2. Антитела группы ОКТ-5/8 выявляют антиген, эквивалентный $Ly-2$, который присутствует на поверхности цитотоксических и супрессорных Т-клеток. Интересно, что популяции ОКТ-4⁺ и ОКТ-5/8⁺ не перекрываются, т.е. эта система не вполне гомологична мышинной, поскольку у человека отсутствует эквивалент популяции $Ly-1+2+3^+$ [72].

3. Антитела ОКТ-3 и UCHL-1 реагируют с частью клеток тимуса и со всеми периферическими Т-клетками [70, 72]. Интересно, что эти антитела оказывают митогенное действие и приводят к выработке интерферона той частью клеток ОКТ-3⁺, которая обладает антигеном ОКТ-4. Выработка интерферона зависит от присутствия моноцитов (клеток, выявляемых антителами ОКТ-М1) [71].

4. Антитела 9/6, Leu-5 и ОКТ-11 (табл. 17.12) подавляют образование розеток с бараньими эритроцитами и, по-видимому, распознают молекулы, идентичные или близкородственные рецептору, с помощью которого происходит образование таких розеток. Антиген, выявляемый этими моноклональными антителами, и рецептор розеток имеют одинаковую биохимическую структуру. Пока неясно, реагируют ли все моноклональные антитела с одним и тем же или разными эпитопами молекулы гликопротеина, связывающего бараньи эритроциты (мол.масса 48 кДа).

5. Антитела ОКТ-6 и NaI/34 выявляют у человека антигены, по-видимому эквивалентные мышинным антигенам TL. Как и антигены TL, они имеются на тимоцитах, но их нет у периферических Т-клеток. Они имеют такое же молекулярное строение (тяжелая цепь с мол.массой 45 кДа и легкая цепь с мол.массой 12 кДа) [68].

6. Антитела ОКТ-9 и 5B7 реагируют лишь с небольшой частью клеток тимуса и Т-клеток периферической крови, но они взаимодействуют с другими, в особенности с быстро делящимися клетками. Недавно было показано, что эти антитела узнают рецептор трансферрина. Среди антител, описанных в этом обзоре, это один из немногих примеров, когда известна природа поверхностного антигена [73].

Описанные антитела оказались очень ценным инструментом для определения характера взаимодействий между субпопуляциями Т-клеток человека. Эти антитела можно использовать для определения количества Т-хелперов и Т-супрессоров. В настоящее время выясняется степень полезности таких определений при лечении различных заболеваний. Очевидно, что у больных, получивших антилимфоцитарную сыворотку, измерение соотношения клеток ОКТ-4⁺ и ОКТ-8⁺ позволяет определить вероятность отторжения трансплантата [3].

Помимо тестов *in vitro* эти моноклональные антитела начинают использовать для предупреждения процессов отторжения как у обезьян, так и у человека. Антитела ОКТ-4 были успешно использованы для продления жизни трансплантата у обезьян, а антитела ОКТ-3 предотвращают отторжение пересаженной почки у человека [3].

Заключение

В этой главе рассматривалось большое число антител, взаимодействующих с лимфоцитами мыши и человека. Каждое из этих антител выявляет уникальный компонент клеточной поверхности, имеющийся у лимфоцитов, хотя и не

обязательно только у них. Многие из этих антител выявляют определенные популяции лимфоцитов. С ними были проведены вдохновляющие эксперименты и клинические испытания, направленные на манипулирование клеточными компонентами иммунного ответа мыши и человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Со временем можно ожидать увеличения числа поверхностных молекул, выявляемых антителами, и есть надежда, что с их помощью удастся выявить все стадии дифференцировки функциональных Т-клеток, В-клеток и клеток других типов. Эффективное, хотя и ограниченное, клиническое применение моноклональных антител для подавления отторжения трансплантата свидетельствует об огромном потенциале их использования для модификации иммунного ответа *in vivo*. Более подробная характеристика нормальных лимфоцитов приведет, очевидно, к лучшему пониманию функционирования иммунной системы в здоровом организме и при различных заболеваниях.

Благодарности

Мы получали денежную помощь от Национального совета здоровья и медицинских исследований Австралии. За техническую помощь мы благодарим S. Douglas и J. Thomson.

ЛИТЕРАТУРА

1. McKenzie I. F. C., Potter T. A. Murine lymphocyte surface antigens, *Adv. Immunol.*, 27, 179—338 (1979).
2. McKenzie I. F. C., Hogarth P. M., O Potter T. A. Further description of murine lymphocyte antigens. In: *Differentiation Antigens of Lymphocytes*, ed. by N. Warner, Academic Press, New York (1983) (in press).
3. Hammerling G. J., Hammerling U., Kearney J. F., eds. *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier/North Holland, Amsterdam (1981).
4. Reif A. E., Allan J. M. V. Specificity of isoantisera against leukemic and thymic lymphocytes, *Nature*, 200, 1322—1333 (1963).
5. Raff M. Theta isoantigen as a marker of thymus derived lymphocytes in mice, *Nature*, 224, 378—379 (1969).
6. Siadak A. W., Nowinski R. C. Thy-2: A murine thymocyte-brain alloantigen controlled by a gene linked to the major histocompatibility complex, *Immunogenetics*, 12, 45—58 (1981).
7. Boyse E. A., Miyazawa M., Aoki T., Old L. J. Ly-A and Ly-B: Two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse, *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 170, 175—192 (1968).
8. Cantor H., Boyse E. A. Functional classes of T lymphocytes bearing different Ly antigens I. The generation of functionally distinct T cell subclasses is a differentiative process independent of antigen, *J. Exp. Med.*, 141, 1376—1389 (1975).
9. Cantor H., Boyse E. A. Functional classes of T lymphocytes bearing different Ly antigens II. Co-operation between subclasses of Ly⁺ cells in the generation of killer activity, *J. Exp. Med.*, 141, 1390—1402 (1975).
10. Ledbetter J. A., Rouse R. V., Micklem S., Herzenberg L. A. T cell subsets defined by expression of Ly 123 and Thy-1 antigens. Two parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis modifies current views, *J. Exp. Med.*, 152, 280—295 (1980).
11. Potter T. A., Hogarth P. M., McKenzie I. F. C. Flow microfluorometric analysis of alloantigen expression during T cell development, *Eur. J. Immunol.*, 10, 899—903 (1980).
12. Lanier L. L., Warner N. L., Ledbetter J. A., Herzenberg L. A. Expression of Lyt-1 antigen on certain murine B cell lymphomas, *J. Exp. Med.*, 153, 998—1003 (1981).
13. Michaelides M., Hogarth P. M., McKenzie I. F. C. The immunosuppressive effect of monoclonal anti-Lyt-1 antibodies *in vivo*, *Eur. J. Immunol.*, 11, 1005—1012 (1981).
14. Lazure C., Hum W. I., Gibson D. M. A major group of mouse kappa chains controlled by the chromosome six locus *IgK-Ef2*, *Exp. Med.*, 152, 555—564 (1980).
15. Goding J. W., Harris A. W. Subunit structure of cell surface proteins: Disulfide bonding in antigen receptors, Ly 2/3 antigens and transferrin receptors of murine T and B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4530—4534 (1981).
16. Nakayama E., Shiku H., Stockert E., Oettgen H. F., Old L. J. Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1977—1981 (1979).

17. *Shinohara N., Sachs D. H.* Mouse alloantibodies capable of blocking cytotoxic T cell function. I. Relationship between the antigen reactive with blocking antibodies and the *Lyt-2* locus, *J. Exp. Med.*, 150, 432—444 (1979).
18. *Potter T. A., McKenzie I. F. C., Cherry M. C.* Murine lymphocyte alloantigens. The *Ly-4* locus, *J. Immunogenet.*, 8, 15—25 (1981).
19. *Omary M. B., Trowbridge I. S.* Disposition of T200 glycoprotein in the plasma membrane of a murine lymphoma cell line, *J. Biol. Chem.*, 255, 1662—1669 (1980).
20. *Tung J. S., Scheid M. P., Pierotti M. A., Hammerling U., Boyse E. A.* Structural features and selective expression of three *Ly-5⁺* cell surface molecules, *Immunogenetics*, 14, 101—106 (1981).
21. *Hyman R., Trowbridge I.* Two complementation classes of T200 (*Ly-5*) glycoprotein negative mutants, *Immunogenetics*, 12, 511—523 (1981).
22. *Glimcher L., Shen F. W., Cantor H.* Identification of a cell surface antigen selectively expressed on the natural killer cell, *J. Exp. Med.*, 145, 1—9 (1977).
23. *Meruelo D., Paolino A., Flieger N., Offer M.* Definition of a new T lymphocyte cell surface antigen, *Ly-II.2*, *J. Immunol.*, 125, 2713—2718 (1980).
24. *Auchincloss H., Ozato K., Sachs D.* Two distinct murine differentiation antigens determined by genes linked to the *Ly-6* locus, *J. Immunol.*, 127, 1839—1843 (1981).
25. *Anderson L. C., Hurme M., Horton M. A., Simpson E., Gahmberg C. G.* Molecular characterisation of the *Ly-6.2* antigen, *Cell Immunol.*, 64, 187—191 (1981).
26. *Matossian-Rogers A., Rogers P., Ledbetter J. A., Herzenberg L. A.* Molecular weight determination of two genetically linked cell surface murine antigen *ThB* and *Ly-6*, *Immunogenetics*, 15, 591—599 (1982).
27. *Potter T. A., Morgen G. M., McKenzie I. F. C.* Murine lymphocyte alloantigens II. The *Ly-7* locus, *J. Immunol.*, 125, 546—550 (1980).
28. *Mathieson B. J., Sharrow S. O., Bottomly K., Fowlkes B. J.* *Ly-9*, an alloantigenic marker of lymphocyte differentiation, *J. Immunol.*, 125, 2127—2136 (1980).
29. *Kimura S., Tada N., Hammerling U.* A new lymphocyte alloantigen (*Ly-10*) controlled by a gene linked to the *Lyt-1* locus, *Immunogenetics*, 10, 363—372 (1980).
30. *Potter T. A., McKenzie I. F. C.* Identification of new murine lymphocyte alloantigens: Antisera prepared between C57L, 129 and related strains define new loci, *Immunogenetics*, 12, 357—369 (1980).
31. *Kimura S., Tada N., Liu Y., Hammerling U.* A new mouse cell surface antigen (*Ly-m18*) defined by a monoclonal antibody, *Immunogenetics*, 13, 547—554 (1981).
32. *Tada N., Kimura S., Taylor B., Hammerling U.* *Ly-m19*: The *Lyb-2* region of mouse chromosome 4 controls a new cell surface alloantigen, *Immunogenetics*, 13, 539—546 (1981).
33. *Shen F. W., Viamontes G., Boyse E. A.* A system of alloantigens that selectively identifies lymph node lymphocytes, *Immunogenetics*, 15, 17—22 (1982).
34. *Ahmed A., Smith A. H.* Surface markers, antigens and receptors on murine T and B cells, *CRC Crit. Rev. Immunol* (1983) (in press).
35. *Yakura H., Shen F. W., Boyse E. A., Tung L.* The *Lyb-2* phenotype of hemolytic PFC, *Immunogenetics*, 10, 603—605 (1980).
36. *Yakura H., Shen F. W., Kaemmer M., Boyse E. A.* *Lyb-2* system of mouse B cells. Evidence for a role in the generation of antibody forming cells, *J. Exp. Med.*, 153, 129—135 (1981).
37. *Cone R. E., Huber B., Cantor H., Gershon R. K.* Molecular identification of a surface structure on B cells (*Lyb-3*) and its relationship to B cell triggering, *J. Immunol.*, 120, 1733—1739 (1978).
38. *Freund J. C., Ahmed A., Budd R. E., Dorf M. E., Sell K. W., Vannier W. E., Humphreys R. E.* The L1210 leukemia cell bears a B lymphocyte specific non-H-2 linked alloantigen, *J. Immunol.*, 117, 1903—1905 (1976).
39. *Ahmed A., Scher I., Sharrow S. O., Smith A. H., Paul W. E., Sachs D. H., Sell K. W.* B lymphocyte heterogeneity: Development and characterisation of an antiserum which distinguishes B lymphocyte differentiation alloantigens, *J. Exp. Med.*, 145, 101—110 (1977).
40. *Kessler S., Ahmed A., Scher I.* *Lyb-6*, a new murine B cell alloantigen: Biochemical characteristics and distribution, *Fed. Proc.*, 37, 1584—1590 (1978).
41. *Kessler S., Ahmed A., Scher I.* Identification and partial molecular and genetic characterisation of an alloantigen expressed on murine B cells. In: *B Lymphocytes in the Immune Response*, ed. by M. Mosier, I. Scher, and E. S. Vitetta, pp. 49—59, Elsevier/North Holland, New York (1978).
42. *Subbarao B., Ahmed A., Paul W. E., Scher I., Lieberman R., Mosier D. E.* *Lyb-7*: A new B cell alloantigen controlled by genes linked to the *IgC_H* locus, *J. Immunol.*, 122, 2279—2285 (1979).
43. *Shen F. W., Boyse E. A.* An alloantigen selective for B cells: *Ly-17.1*, *Immunogenetics*, 11, 315—317 (1981).

44. Kimura S. et al. A new mouse cell surface antigen (Ly-m20) controlled by a gene linked to *Mls* locus, and defined by monoclonal antibodies, *Immunogenetics*, 14, 3—14 (1981).
45. Takahashi T., Old L. J., Boyse E. A. Surface alloantigens of plasma cells, *J. Exp. Med.*, 131, 1325—1341 (1970).
46. Tada N., Kimura S., Hoffman M., Hammerling U. A new surface antigen (PC.2) expressed exclusively on plasma cells, *Immunogenetics*, 11, 351—362 (1980).
47. Festenstein H., Bishop C., Taylor B. H. Location of *Mls* locus on mouse chromosome 1. *Immunogenetics*, 5, 357—361 (1977).
48. Tonkonogy S. L., Winn H. J. A new system associated with the *Mls* locus in the mouse, *J. Immunol.*, 116, 835—841 (1976).
49. Eichwald E. J., Schlimmer C. R. Communication, *Transplant. Bull.*, 2, 418 (1954).
50. Ohno S. Major sex determining genes. In: *Monographs on Endocrinology*, Vol. 11, ed. by F. Gross, A. Labhard, M. B. Lipsett, T. Mann, L. T. Samuels, and J. Zander, Springer-Verlag, New York (1979).
51. Zeicher M., Mozes E., Lonat P. Lymphocyte alloantigens associated with X-chromosome linked immune response genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 721—724 (1977).
52. Ledbetter J. A., Herzenberg L. A. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens, *Immunol. Rev.*, 47, 63—90 (1979).
53. McKenzie I. F. C., Zola H. Monoclonal antibodies to B cells, *Immunology Today*, 4, 10—15 (1983).
54. Nowinski R. C., Klein P. A. Anomalous reactions of mouse alloantisera with cultured tumor cells II. Cytotoxicity is caused by antibodies to leukemia viruses, *J. Immunol.*, 115, 1261—1268 (1975).
55. Wecker E., Schimpl A., Hunig T. Expression of MuLV gp 71-like antigens in normal mouse spleen cells induced by antigenic stimulation, *Nature*, 269, 598—600 (1977).
56. Langdon W. Y., McKenzie I. F. C., Shellam G. R. Ly- and ecotropic MuLV antigens are separate entities, *J. Immunogenet.* (1983) (in press).
57. Huber B. et al. Cell mediated immunity: Delayed type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T-cell subclasses, *J. Exp. Med.*, 143, 1534—1539 (1976).
58. Feldman M., Beverly P. C. L., Dunkley M., Kontianen S. Different Ly antigen phenotypes of in vitro induced helper and suppressor cells, *Nature*, 258, 614—615 (1975).
59. Cantor H., Boyse E. A. Regulation of the immune response by T cell subclasses, *Contemp. Top. Immunobiol.*, 7, 1977—1992 (1977).
60. Hogarth P. M., Potter T. A., Cornell F. N., McLachlan R., McKenzie I. F. C. Monoclonal antibodies to murine cell surface antigens I. Lyt-1.1, *J. Immunol.*, 125, 1618—1624 (1980).
61. Thompson C. H., Potter T. A., McKenzie I. F. C., Parish C. R. Phenotype of the DTH suppressor cell, *Immunology*, 40, 87—96 (1980).
62. Loveland B. E. et al. Cells mediating graft rejection in the mouse I. Lyt-1 cells mediate skin graft rejection, *J. Exp. Med.*, 153, 1044—1057 (1981).
63. Loveland B. E., McKenzie I. F. C. Delayed type hypersensitivity and allograft rejection in the mouse: Correlation of effector cell phenotype, *Immunology*, 46, 313—320 (1982).
64. Hogarth P. M., Edwards J., McKenzie I. F. C., Goding J. W., Liew F. Y. Monoclonal antibodies to murine Ly-2.1 surface antigens, *Immunology*, 46, 135—139 (1982).
65. Germain R. N., Benacerraf B. Helper and suppressor T cell factors, *Springer Semin. Immunopathol.*, 3, 129—144 (1980).
66. Tada T., Okumura K. The role of antigen specific T cell factors in the immune response, *Adv. Immunol.*, 28, 1—88 (1979).
67. McDougal J. S., Shen F. W., Cort S. P., Barot J. Feedback suppression: Phenotypes of T cell subsets involved in the Ly-1 T cell-induced immunoregulatory circuit, *J. Immunol.*, 125, 1157—1160 (1980).
68. Howard F. D., Ledbetter J. A., Wong J., Bieber C. P., Stinson E. B., Herzenberg L. A. A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation, *J. Immunol.*, 126, 2117—2122 (1981).
69. Engleman E. G., Warnke R., Fox R. I., Levy R. Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1791—1795 (1981).
70. Beverley P. C. L., Callard R. E. Distinctive functional characteristics of human «T» lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody, *Eur J. Immunol.*, 11, 329—335 (1981).
71. Vaneway J. et al. Suppression of human T-cell mitogenesis and E rosette formation by the monoclonal antibody OKT-11A, *Immunology*, 44, 865—871 (1981).
72. Reinherz E. L., Schlossman S. F. Differentiation and function of human T lymphocytes, *Cell*, 19, 821—827 (1980).
73. Sutherland R., Delia D., Schneider C., Newman R., Kemshead J., Greaves M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4515—4519 (1981).

Регуляция иммунного ответа

Глава 18

Хелперные влияния, супрессия и специфические факторы

Томио Тада

(*Tomio Tada*)

18.1. Клеточные взаимодействия в регуляции антительного ответа: краткий обзор

Выявление двух основных популяций лимфоцитов Т- и В-клеток (гл. 3—6 и последующий анализ крайне сложных регуляторных взаимодействий лимфоидных клеток стимулировали необычайно плодотворное развитие клеточной иммунологии. Одно из центральных положений современной иммунологии состоит в том, что иммунная система представляет собой комплекс взаимодействующих клеток с внутренними регуляторными принципами. Первоначальная концепция взаимодействий Т- и В-лимфоцитов значительно осложнилась в связи с необходимостью включить в нее несколько различных типов регуляторных клеток, которые определяют сетевую организацию имунорегуляторной системы.

В этой главе мы обсудим два основных регуляторных события при иммунном ответе, в частности при образовании антител. Эта регуляция определяется хелперной и супрессорной функциями Т-лимфоцитов. Хотя эти функции связаны исключительно с активностью соответствующих клеток, существует ряд сложных клеточных взаимодействий, которые затрагивают разные типы клеток и приводятся в действие совершенно различными, но жестко контролируемыми механизмами. В дополнение к последовательной активации взаимодействующих клеток на каждом из путей существуют этапы, на которых внутренние системы торможения по принципу обратной связи или усиления модифицируют конечный эффект. Таким образом, иммунный ответ представляется тщательно регулируемым процессом, в котором антиген играет роль инициатора, вовлекающего в процесс семейство хелперных и супрессорных клеток, что в результате приводит к нейтрализации стимулирующего антигена (иммунологическая сеть).

В принципе существуют три разных типа клеточных взаимодействий, знание которых необходимо для обсуждения регулярных событий в следующих разделах. Рассмотрим вкратце некоторые основные концепции клеточных взаимодействий.

18.1.1. Когнатное взаимодействие или сочетанное распознавание

Распознавание двумя функционально различающимися клетками антигенных детерминант одной молекулы, необходимое для осуществления определенных клеточных взаимодействий, называется *когнатным взаимодействием* или *сочетанным распознаванием*¹. Регуляторное влияние на клетки одного типа, вероятно, передается клеткам другого типа посредством антигенного мостика между взаимодействующими клетками. Такое же действие могут оказывать

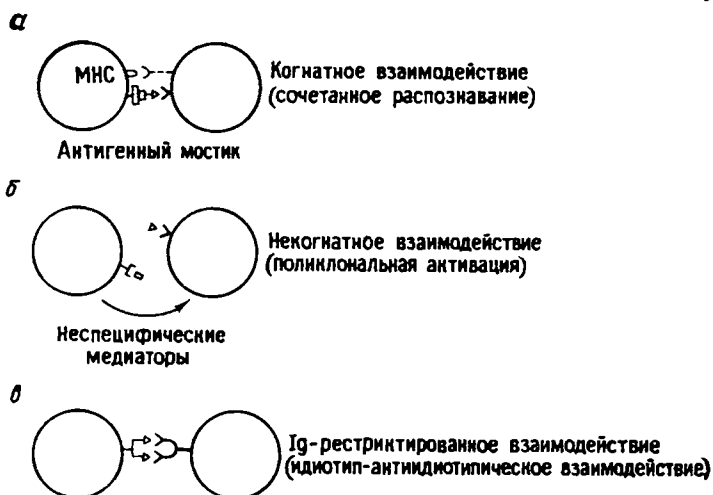


Рис. 18.1. Различные типы клеточных взаимодействий в регуляции иммунного ответа. а. Когнатная помощь или сочетанное распознавание при образовании «антигенного мостика». Две взаимодействующие клетки часто распознают разные детерминанты антигена. В некоторых случаях необходимо совпадение этих клеток по определенным молекулам МНС, при этом одна клетка распознает молекулу МНС другой клетки-партнера (распознавание «своего»). б. Некогнатная помощь или поликлональная акти-

вация, опосредованная неспецифическими медиаторами, которые высвобождает одна из взаимодействующих клеток. Обе клетки должны быть стимулированы антигеном, однако экспрессия этих антигенных детерминант на одной молекуле не обязательна. в. Ig-рестриktированное взаимодействие или идиотип-антиидиотипическое взаимодействие. Клетки распознают Ig или «Ig-подобные» детерминанты клеток-партнеров. Для индукции клеточных взаимодействий этого типа может быть необходим антиген.

антиген-специфические факторы, которые продуцируются регуляторными клетками и которые фокусируются на клетках-мишенях при связывании с антигеном. Во многих случаях эти две взаимодействующие клетки узнают разные антигенные детерминанты (например, гаптена и носителя при ответе на конъюгат гаптен-носитель) одной молекулы (рис. 18.1, а). Этот тип хелперных и супрессорных клеток часто называют Т-хелперами, специфическими к носителю (СТh), и Т-супрессорами, специфическими к носителю (СТs). Другое важное свойство таких антиген-специфических регуляторных Т-клеток — это специ-

¹ Термин *когнатные*, или *близкие*, *сопряженные*, взаимодействия введен Тадой для обозначения опосредованных антигеном, МНС-рестриktированных взаимодействий, при которых Т-лимфоцит распознает антигенную детерминанту в сочетании с сингенной молекулой МНС на поверхности клетки-партнера, например, В-лимфоцита. Для таких взаимодействий необходим непосредственный контакт взаимодействующих клеток. *Некогнатные*, или *дистантные*, взаимодействия опосредуются растворимыми неспецифическими факторами и не требуют контакта взаимодействующих клеток. — Прим. перев.

фичность, обычно и к антигену, и к продуктам генов главного комплекса гистосовместимости (гены *MHC*) клетки-партнера. Таким образом, регуляторное действие таких клеток зависит не только от наличия антигена, но во многих случаях ограничено продуктами генов *MHC*. В принципе эти клетки активируются только в том случае, если антиген представлен в ассоциации с *Ia*-молекулами на специализированных макрофагальных клетках (гл. 15); они могут взаимодействовать с клетками-мишенями лишь при условии, что последние несут тот же гаплотип *Ia*, что и антиген-презентирующие макрофаги.

18.1.2. Поликлональное взаимодействие или несочетанное распознавание

Некоторые антиген-специфические регуляторные клетки продуцируют при антигенной стимуляции антиген-неспецифические медиаторы, такие, как фактор, замещающий Т-клетки (ТЗФ, TRF), интерлейкин 2 (ИЛ-2) и растворимый супрессор иммунного ответа (РСИО, SIRS). Такие медиаторы действуют непосредственно на специализированные акцепторные участки отвечающих клеток (рис. 18.1, б), экспрессия которых индуцируется антигеном или другими факторами, такими, как интерлейкин 1 (ИЛ-1). Процесс активации-дифференцировки в ответ на неспецифические медиаторы в настоящее время интенсивно исследуется (гл. 12). Следует отметить, что, хотя конечное действие таких клеток определяется неспецифическими медиаторами, для образования этих медиаторов необходима активация клеток специфическим антигеном, представленным на антиген-презентирующей клетке. Следовательно, исходный этап регуляции этого типа по сути также зависит от *MHC*-рестриктированной антигенной стимуляции, как и в случае когнатного взаимодействия. Образование таких неспецифических медиаторов индуцируется не только антигеном, но и аллогенными клетками-стимуляторами или митогенными лектинами.

18.1.3. Ig-рестриктированные или антиидиотипические взаимодействия

Как уже отмечалось, некоторые регуляторные клетки контролируют образование антител определенного идиотипа, аллотипа и изотипа (гл. 19). Считается, что этот процесс связан с действием специализированных Т-клеток, распознающих антигенные детерминанты Ig на клетках-мишенях (рис. 18.1, в). Описаны и хелперные, и супрессорные клетки этого типа, Ig-специфические Т-хелперы (IgTh, Ig-T_x) и Ig-специфические Т-супрессоры (IgTs, Ig-T_c). Такие Т-клетки, специфичные к идиотипу, имеют важное значение для понимания сетевой регуляции иммунного ответа (гл. 22). В принципе специфическая к рецептору (идиотипу) регуляция может происходить в отсутствие антигена, например, идиотипический Т-супрессор-индуктор (Ts1) активирует антиидиотипическую Т-клетку (Ts2), которая в свою очередь активирует третью Т-клетку (Ts3), идиотип-положительную. Существование такой последовательной ассоциированной с идиотипом активации клеток означает, что идиотипическая сеть — неотъемлемая особенность регуляторной системы и что работа этой системы запускается антигеном или антиидиотипическим реагентом, нарушающим равновесие клеточной системы. В случае аллотип-специфической супрессии Т-супрессоры, генерированные у животных F₁, специфичны к одному родительскому аллотипу и, по-видимому, не влияют ни на В-лимфоциты, ни на антиген-специфические Т-хелперы. Такие Т-супрессоры нейтрализуют специализированную субпопуляцию Т-клеток, оказывающих хелперное действие при обра-

зовании Ig данного, но не другого аллотипа. В этом случае аллотип-специфические Т-супрессоры также взаимодействуют с аллотип-специфическими Т-хелперами, которые в конце концов узнают аллотипические детерминанты отвечающих В-лимфоцитов.

Некоторые идиотип-специфические регуляторные Т-клетки специфичны также и к носителю. Предполагается, что часть хелперных Т-клеток (Th2) несет два вида рецепторов: один специфичен к идиотипу, а другой — к антигену. В случае этих Т-клеток не обнаружено МНС-рестрикции — в отличие от двух нижеупомянутых типов СTh. Вместо этого взаимодействие таких клеток с В-лимфоцитами рестриктировано по детерминантам Ig, в частности по идиотипу, и определяется скорее антиидиотипическим рецептором Т-клетки, а не образованием антигенного мостика. В принципе клетки этого типа сами по себе не могут обеспечить активацию В-лимфоцитов, но при когнатном взаимодействии с другими СTh могут усиливать образование антител данного идиотипа.

Используя в основном три модели клеточных взаимодействий, приведенные на рис. 18.1, мы обсудим основные феномены, обнаруженные в течение последних десяти лет при анализе хелперных и супрессорных влияний на антигательный ответ. Как ни скудны наши представления о действительных характеристиках этих взаимодействий, происходящих в организме, читателю все же предлагается принять участие в увлекательном процессе анализа пока необъяснимых феноменов, которые, возможно, облегчат изучение важных регуляторных принципов иммунной системы.

18.2. Хелперные Т-клетки

18.2.1. Открытие взаимодействий Т- и В-лимфоцитов при иммунном ответе

Широко известно, что удаление тимуса у новорожденных мышей приводит к нарушениям в развитии и функции лимфоидной системы, что в свою очередь приводит к снижению числа лимфоцитов в лимфоидной ткани, подавлению способности к отторжению трансплантата и ранней смерти вследствие повышения чувствительности к инфекциям [1, 2]. Тем не менее до середины 60-х годов значение тимуса оставалось по существу неясным. В различных лабораториях были предприняты независимые попытки выяснить, почему у неонатально тимэктомированных мышей подавляется способность к антителообразованию. В этих работах был сделан вывод, что клетки тимуса и костного мозга кооперативно взаимодействуют при индукции антительного ответа. Свои наблюдения авторы подробно описали в отдельных обзорах [3—5], с помощью которых читатель может поближе познакомиться со столь волнующими открытиями. За этими данными последовало открытие кооперации двух различных и независимых классов лимфоцитов, распознающих разные детерминанты одной молекулы антигена при образовании антител как к белковому антигену, так и к конъюгатам гаптен-носитель [6, 7]. В результате этих двух групп экспериментов было точно установлено существование кооперации между двумя классами лимфоцитов, необходимой для антительного ответа на большинство, но не на все антигены. В этом разделе мы рассмотрим некоторые существенные исходные работы, сформировавшие основную модель Т-В-взаимодействий.

18.2.1.1. Синергизм клеток тимуса и костного мозга

Кläмен и др. [8] первыми показали, что если облученным мышам вводить смесь клеток тимуса и костного мозга вместе с антигеном (бараньими эритроцитами, БЭ), то наблюдаемый антительный ответ будет значительно выше (по результатам определения гемолитических бляшек), чем у животных, которым вводили клетки лишь одного типа. Кооперативный ответ клеток тимуса и костного мозга находился в линейной зависимости от числа тех и других клеток в смеси. Результаты эти были интерпретированы следующим образом: костномозговая популяция содержит «эффекторные» клетки, которые в конечном счете продуцируют антитела только в присутствии «вспомогательных» клеток тимуса. Эти «вспомогательные клетки», вероятно, являются наиболее ранним описанием «хелперных» Т-клеток.

Вскоре последовали тщательные исследования Миллера и Митчелла [9], показавших, что антительный ответ неонатально тимэктомированных мышей или мышей, тимэктомированных во взрослом состоянии с последующим облучением и пересадкой костного мозга, резко усиливается при пассивном переносе клеток тимуса или грудного лимфатического протока сингенных мышей. Используя клетки с хромосомным маркером Т6 или различными маркерами Н-2, они установили, что предшественники антителообразующих клеток (АОК) возникают из костномозговых клеток, для дифференцировки которых в АОК необходима одновременная активация клеток тимусного происхождения. Дэвис и др. [10] пришли к такому же выводу, используя тимэктомированных радиационных химер, которым пересаживали тимус от мышей одной линии и клетки костного мозга от другой. Поскольку клетки костного мозга и тимуса экспрессировали разные трансплантационные антигены, клетки одного типа можно было избирательно удалить обработкой антителами против Н-2 и комплексом и определить функцию оставшихся клеток. С помощью этого метода было установлено, что клетки тимуса не способны продуцировать антитела, но их пролиферативный ответ необходим для образования антител костномозговыми клетками-партнерами. Было установлено, что для антительного ответа оба типа клеток должны быть стимулированы антигеном.

Дальнейшие работы этих исследователей легли в основу концепции синергизма клеток тимуса и костного мозга при антительном ответе на бараньи эритроциты. Хотя клетки костного мозга содержат собственно клетки-предшественники АОК, клетки тимуса специфически взаимодействуют с антигеном, чтобы выполнить вспомогательную функцию при образовании антител костномозговыми клетками. Ранним исследованиям, обосновавшим эту классическую схему, посвящены специальные обзоры [11].

Однако действительная природа взаимодействий клеток тимуса и костного мозга была неизвестна. Считалось, что клетки тимусного происхождения выполняют некую неспецифическую вспомогательную функцию или вырабатывают неспецифические фармакологические факторы, которые каким-то способом ускоряют дифференцировку клеток костного мозга. С помощью системы двойного переноса клеток облученным реципиентам, когда тимоциты, активированные бараньими эритроцитами после введения первому облученному реципиенту, переносили второму облученному реципиенту, которому был пересажен костный мозг, а затем иммунизировали такого второго реципиента бараньими эритроцитами или эритроцитами животных других видов, Митчелл и Миллер [12] показали, что только эритроциты, гомологичные использованным для первичной стимуляции тимоцитов, способны вызывать кооперативный ответ у второго реципиента. Из этого можно сделать вывод, что кооперация клеток тимуса

са и костного мозга связана не с неспецифическим фармакологическим эффектом, а со специфическим взаимодействием клеток этих двух типов, опосредованным антигеном.

Концепция синергизма клеток костного мозга и тимуса была вскоре подтверждена в опытах по антительному ответу *in vitro* на БЭ и некоторые другие антигены. В этой работе показано, что лимфоциты тимусного происхождения необходимы для индукции первичного и вторичного антительного ответа, так как обработка отвечающих клеток антисывороткой против Thy-1 и комплементом приводит к подавлению антительного ответа [12]. Первичная активация тимусных клеток антигеном необходима для оптимального вторичного антительного ответа иммунных В-лимфоцитов *in vitro* на БЭ.

18.2.1.2. Эффект носителя

Обнаружение синергизма в активности клеток тимуса и костного мозга помогло выявить механизм феномена, известного под названием «эффект носителя». Уже в течение многих лет было известно, что антительный ответ на гаптен зависит от иммуногенности носителя и что для максимального ответа на гаптен животное нужно иммунизировать гаптенем, конъюгированным с тем же самым носителем, который был использован для первичной иммунизации [13]. Индукция толерантности к носителю отменяет антительный ответ на гаптен, конъюгированный с этим носителем. Таким образом, активация клеток, продуцирующих антитела к гаптenu, в значительной степени зависит от той части молекулы, которая непосредственно не распознается антителом. Этот феномен, названный эффектом носителя, сейчас рассматривается в свете взаимодействий Т- и В-лимфоцитов.

Две независимые группы пришли к одному и тому же выводу и сообща выдвинули гипотезу о взаимодействии Т- и В-лимфоцитов при распознавании двух различных антигенных детерминант одной молекулы антигена. Раевский и др. [6, 14] показали, что при иммунизации кролика лактат-дегидрогеназа свиньи (ЛДГ) ведет себя как конъюгат гаптен-носитель, поскольку для индукции антительного ответа необходимо, чтобы различные антигенные детерминанты на разных субъединицах ЛДГ действовали синергически. Для иммуногенности ЛДГ необходимо наличие более чем одной антигенной детерминанты, т.е. наличие двух различных субъединиц в форме полимера. Митчисон [15, 16] использовал хорошо изученную систему переноса облученным сингенным реципиентам клеток селезенки мышей, иммунизированных конъюгатом 4-гидрокси-5-йод-3-нитрофенилацетил (НИР, ИНФА)-овальбумин (ОА). При вторичной иммунизации гомологичным конъюгатом ИНФА-ОА животные давали хороший вторичный анти-ИНФА ответ, тогда как гетерологичный конъюгат, ИНФА-бычий сывороточный альбумин (БСА), не индуцировал анти-ИНФА ответа. Однако, если облученным реципиентам вводили иммунные к ИНФА-ОА клетки селезенки вместе с клетками доноров, иммунизированных к БСА, то конъюгат ИНФА-БСА вызывал выраженный вторичный анти-ИНФА ответ. Это указывает, что клетки, специфичные ко второму носителю (БСА), могут кооперировать с ИНФА-специфическими клетками в присутствии ИНФА-БСА. Схема этих принципиальных экспериментов приведена на рис. 18.2. Проведенные в дальнейшем эксперименты Раффа [17] показали, что клетки, специфичные к носителю, происходят из тимуса, а клетки, специфичные к гаптenu, — из костного мозга и что для эффективной кооперации клеток детерминанты, стимулирующие Т- и В-лимфоциты, должны быть представлены на одной и той же молекуле. Поскольку сами по себе Т- клетки не продуцируют антител, но необходимы для

стимуляции синтеза антител В-лимфоцитами, то вовлеченный в это кооперативное взаимодействие Т-лимфоцит называется хелперной Т-клеткой.

Сходное кооперативное взаимодействие между клетками, специфичными к носителю, и клетками, специфичными к гаптену, можно продемонстрировать с помощью процедуры, именуемой *дополнительной иммунизацией*. Кролики, иммунизированные конъюгированной с БСА п-диазобензолсульфокислотой (сульфанилом), давали вторичный антителыный ответ на сульфанил-БГГ, если животных в промежутке дополнительно иммунизировали носителем, бычьим гамма-глобулином (БГГ) [18]. Таким образом, БГГ-специфические Т-хелперы

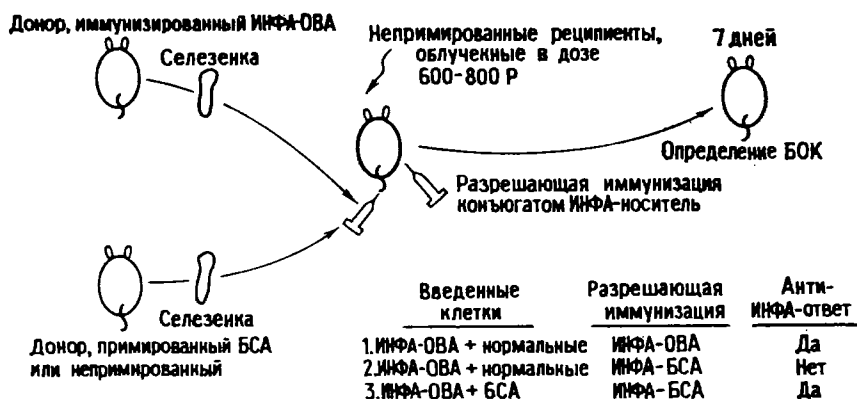


Рис. 18.2. Определение кооперации хелперных Т-клеток и В-лимфоцитов. (по [15].) Схема эксперимента и полученные результаты

показаны на рисунке. Детали см. в тексте.

помогали независимо при введении животным конъюгата сульфанил-БГГ, который связывал эти два типа клеток. Аналогичный эффект наблюдали также исследователи, использовавшие другие конъюгаты гаптен-носитель [19, 20]. Поскольку антитела к носителю сами по себе не обладают такой хелперной активностью, эти исследователи установили, что лимфоидные клетки, иммунные ко второму гетерологичному носителю, проявляют хелперную активность, специфичную к носителю. Эта хелперная активность, вероятно, опосредована теми же хелперными Т-клетками, которые работают при адоптивном вторичном антителыном ответе. Хотя мы должны будем рассмотреть супрессорное влияние предварительной иммунизации носителем на гаптен-специфический ответ, дополнительная иммунизация носителем индуцирует тип клеток, необходимый для когнатного взаимодействия с гаптен-специфическими В-лимфоцитами.

Правомочность этой концепции была вскоре подтверждена опытами по анти-телообразованию *in vitro*, в которых можно использовать более сложные комбинации Т- и В-лимфоцитов. Кроме того, системы *in vitro* обладают значительным преимуществом, открывая возможность изучения относительного участия в ответе не только Т- и В-лимфоцитов, но и макрофагов, и клеточных продуктов, например Т-клеточных факторов. В ряде исследований показано, что клетки селезенки, иммунные к гаптену, дают антителыный ответ при вторичной стимуляции *in vitro* конъюгатом гаптен-носитель только при наличии соответствующих носитель-специфических хелперных клеток. Некоторые исследователи обнаружили, что взаимодействие между клетками, примированными носителем и гаптеном, происходит, если они разделены непроницаемой для клеток мем-

браной. Эти данные указывали на присутствие специфического медиатора, действие которого, вероятно, связано с макрофагами [21, 22]. В дальнейшем было установлено, что в определенных экспериментальных системах для эффективного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов не обязательно присутствие детерминант гаптена и носителя на одной и той же молекуле [23—25]. Эти на первый взгляд противоречивые наблюдения свидетельствуют о том, что взаимодействие Т- и В-лимфоцитов может осуществляться по-разному и опосредоваться различными механизмами.

18.3. Виды хелперных взаимодействий

18.3.1. Когнатные и некогатные хелперные взаимодействия

Хотя установлено, что для дифференцировки большинства В-лимфоцитов в антителообразующие клетки требуется помощь со стороны Т-клеток, споры о механизмах Т-хелперной регуляции активации В-лимфоцитов не утихают. Наиболее простая точка зрения, учитывающая наличие кооперативных взаимодействий Т- и В-клеток, заключается в следующем: Т-клетки улавливают и концентрируют антиген на своей поверхности и фокусируют тем самым антигенные детерминанты для соответствующих рецепторов В-лимфоцитов [26—28]. Кроме предположения о концентрировании антигена эта модель постулирует, что антиген обеспечивает тесный контакт между Т- и В-лимфоцитами, являясь мостиком, соединяющим клетки этих двух типов. Таким образом, гипотеза антигенного мостика утверждает, что это взаимодействие позволяет эффективно передавать от Т-лимфоцита к В-лимфоциту определенные сигналы, необходимые для дифференцировки В-лимфоцита [25, 28]. Примером таких сигналов могут служить продуцируемые Т-клетками лимфокины, такие, как интерлейкин 2 и ТЗФ. Однако во многих случаях молекулярная основа хелперных влияний не ограничивается только локальным образованием неспецифических медиаторов. Как правило, наиболее эффективное Т-В-взаимодействие происходит лишь при наличии детерминант, распознаваемых Т- и В-лимфоцитами, на одной и той же молекуле [6, 7]. Следует отметить, что иммунные к гаптену и носителю клетки селезенки, перенесенные облученному реципиенту, не кооперируют при ответе на стимуляцию носителем и гаптеном, представленными на разных молекулах, особенно при IgG-антительном ответе [20]. Итак, уже «минимальная» теория, игнорирующая сложную функцию макрофагов в кооперации Т- и В-лимфоцитов, постулирует, что физическая сближенность иммунных к гаптену В-клеток и иммунных к носителю Т-лимфоцитов, обусловленная наличием антигенного мостика, оказывается необходимым условием для эффективного взаимодействия клеток (когатное взаимодействие). Это общее правило было подтверждено рядом исследователей, работавших с разными экспериментальными системами. Однако спор о необходимости физического контакта между клетками так и не был окончательно решен. Кроме того, было обнаружено другое условие эффективных взаимодействий Т- и В-лимфоцитов, а именно идентичность между Т- и В-лимфоцитами по генам *МНС* [29, 30]. Тот факт, что Т-хелпер распознает не только сам антиген, но и собственную молекулу *МНС*, также хорошо установлен [31, 35], хотя и существуют значительные разногласия по поводу необходимости Т-клеточного распознавания детерминант *МНС* на В-лимфоцитах. Таким образом, модель когатных взаимодействий постулирует не только образование антигенного мостика, но также и распознавание Т-клеткой сингенных Ia-молекул на взаимодействующей с ней В-клетке.

Вторая модель поликлональных хелперных взаимодействий предсказывает активацию В-клеток продуцируемыми Т-клетками неспецифическими медиаторами; образования антигенного мостика между двумя клетками при этом не требуется. Существует много примеров, когда Т-клетки, специфически стимулированные соответствующим антигеном, могут усиливать В-клеточный ответ на посторонний антиген. Подобная активность Т-клеток во многих случаях заменяется бесклеточным супернатантом культур Т-клеток, стимулированных антигеном *in vitro*. Аллогенная или митогенная стимуляция также вызывает высвобождение таких неспецифических факторов Т-клеток. Эти неспецифические медиаторы представляют собой тесно связанное семейство молекул. Считается, что в отсутствие таких Т-клеточных факторов антиген переводит В-лимфоцит в какое-то активированное состояние. Некоторые В-лимфоциты, обладающие высокоаффинными рецепторами к антигену, в отсутствие Т-клеточных влияний на этой стадии дифференцировки могут быть «заморожены», но в присутствии соответствующих Т-клеточных факторов В-лимфоциты дифференцируются дальше в антителообразующие клетки. В этом процессе дифференцировки, по-видимому, участвует множество неспецифических факторов. Вероятно, стимуляция В-лимфоцитов соответствующим антигеном приводит к экспрессии на клеточной мембране акцепторных участков для Т-клеточных факторов. Этот тип Т-клеточной помощи при образовании антител В-лимфоцитами получил название *некогнатной (несочетанной)* или *поликлональной хелперной помощи*, поскольку теоретически любые В-лимфоциты, стимулированные различными антигенами, чувствительны к неспецифическим медиаторам. Внутриклеточные процессы активации В-лимфоцитов и трансмембранные сигналы, передаваемые неспецифическими Т-клеточными факторами, в настоящее время интенсивно изучаются. Как будет рассмотрено ниже, такие неспецифические медиаторы Т-лимфоцитов неодинаковы и по-разному действуют на В-лимфоциты, находящиеся на разных стадиях дифференцировки.

Хотя и когнатная, и некогнатная формы Т-клеточной помощи являются основными механизмами, усиливающими дифференцировку В-клеток, они обычно действуют одновременно и синергично. Таким образом, в массе своей Т-клетки, активированные антигеном в сочетании с собственными молекулами МНС, осуществляют две разные хелперные функции. Часть Т-клеток находит подходящие В-лимфоциты для осуществления когнатных МНС-рестриктированных клеточных взаимодействий, тогда как другие продуцируют неспецифические факторы, которые при связывании с акцепторными участками В-лимфоцитов позволяют им дифференцироваться в антителообразующие клетки. В связи с этим возникают следующие вопросы: 1) определяются ли эти две формы кооперации при физиологических условиях одними и теми же Т-хелперами или их разными субпопуляциями? 2) одни и те же или различные субпопуляции В-лимфоцитов могут быть активированы в результате когнатной и поликлональной помощи? 3) необходимы ли различные типы помощи на разных стадиях В-клеточной дифференцировки? Для ответа на эти вопросы следует рассмотреть различные типы Т-хелперных клеток.

18.3.2. Гетерогенность хелперных Т-клеток

Поскольку существует, по-видимому, более одного механизма клеточной помощи при образовании антител В-лимфоцитами, спрашивается, опосредованы ли эти хелперные взаимодействия одной или несколькими популяциями Т-клеток. Хотя четко установлено, что большинство Т-хелперов принадлежат к субпопуляции $\text{Lyt-1}^+2^-3^-$, ряд проведенных недавно работ указывает на суще-

ствование двух и более типов хелперных Т-клеток, которые независимо или синергично вызывают усиление В-клеточного ответа. Мы обсудим выявленную гетерогенность хелперных Т-клеток в связи с различными видами Т-клеточной помощи при антительном ответе.

18.3.2.1. Т-клетки, специфичные к носителю

Описаны два различных типа Т-хелперов, специфичных к носителю (СTh, НТх). Они определяются по различиям в способе действия и в поверхностных антигенных характеристиках. Клетки этих типов часто обозначаются Т_{х1} и Т_{х2} (Th1 и Th2) [36, 91].

Th1 можно определить как традиционные СTh, которым необходимо сочтанное распознавание антигена (близкое взаимодействие) для активации В-лимфоцитов. Th1 представляет основную хелперную клетку в обычной популяции Т-лимфоцитов, очищенной на колонке с нейлоновой ватой, и, вероятно, обеспечивает минимальные условия для индукции Т-зависимого антительного ответа. По-видимому, Th1 распознает антиген в ассоциации с собственными молекулами Ia на антиген-презентирующих клетках (АПК) и кооперирует с В-лимфоцитами только в тех случаях, когда В-лимфоциты несут ту же область I, что и Т-клетки. Сами Th1-клетки не экспрессируют Ia-белки или антиген Qa-1 (по результатам, полученным при определении с помощью обычных аллоантител).

Хотя Th1 является хелперной Т-клеткой, активность которой за последние десять лет исследовалась наиболее детально, молекулярные механизмы, посредством которых Th1 стимулирует В-клеточный ответ, в основном неизвестны. Природа антиген-специфического рецептора клеток этого типа и специфических продуктов, обуславливающих хелперный эффект, по-прежнему остается неясной. Ниже мы детально рассмотрим некоторые из этих вопросов. Тем не менее общепринято, что этот тип клеток представляет единственные независимо действующие хелперные Т-клетки, необходимые для В-клеточного ответа на большинство Т-зависимых антигенов.

Номенклатура Th2 еще окончательно не утвердилась, поскольку две группы исследователей при обозначении Th2 исходят из различных критериев [36, 37]. Однако мы рассматриваем этот тип клеток как часть популяции СTh, так как в следующем разделе будут разобраны Th, рестриктированные по детерминантам Ig. СTh2, как особая популяция Т-хелперов, описаны несколькими исследователями, использовавшими различные экспериментальные системы. В качестве примера можно привести разделение Т-клеток мышей, примированных носителем, на фракции, прикрепляющиеся и не прикрепляющиеся к нейлоновой вате, и последующее определение их хелперной активности [36]. Хотя обе фракции могли независимо «помогать» В-лимфоцитам, добавление небольшого числа клеток одной фракции к другой приводило к резкому усилению антительного ответа по сравнению с ответом, наблюдаемым в тех случаях, когда каждая из этих Т-клеток присутствовала в отдельности. СTh1, не прикрепляющиеся к нейлоновой вате Т-клетки, были способны помогать В-лимфоцитам только при стимуляции соответствующим конъюгатом гаптен-носитель (когнатная помощь), тогда как СTh2 могли помогать В-лимфоцитам, стимулированным гаптеном на другом носителе (некогнатная помощь). Кроме того, активность СTh2 отменялась при обработке антителами против молекул Ia и комплементом, хотя такая обработка не влияла на активность Th1 [36, 91]. Лocus, контролирующий экспрессию белков Ia на Th2, был картирован в субобласти I-J. Различия в двух популяциях хелперных Т-клеток, участвующих в когнатной и некогнатной помощи, описаны и другими авторами [38—41].

18.3.2.2. Т-хелперы, специфичные к Ig

В настоящее время существует множество доводов в пользу того, что Т-клетки регулируют образование антител определенного класса, аллотипа или идиотипа (гл. 19). Считается, что этот процесс связан с действием специализированной субпопуляции Т-лимфоцитов, способных непосредственно распознавать изотипические, аллотипические или идиотипические детерминанты поверхностных Ig В-лимфоцитов. Мы обозначаем такие Т-хелперы IgTh. Герценберг и др. [42, 43] показали, что у животных F_1 супрессия антител IgG_{2a} одного, но не другого аллотипа можно индуцировать введением новорожденным мышам антиаллотипических антител. Такая супрессия определенного аллотипа вызвана генерацией специфических к аллотипу Т-супрессоров (Ts). Мишенью аллотип-специфических Ts служат не Т-хелперы, специфичные к носителю, а клетки, избирательно поддерживающие образование Ig одного аллотипа (IgTh) [44]. Это было по существу первым указанием на существование Ig-рестриктированных Т-хелперов. Кроме того, животные, у которых было подавлено образование Ig одного аллотипа, тем не менее могли генерировать В-клетки памяти, способные продуцировать этот аллотип; однако созревание аффинитета (сродства) антител этого аллотипа было сильно заторможено [45]. Итак, IgTh могут участвовать в сложной регуляции В-клеточной дифференцировки, в том числе в созревании аффинности продуцируемых антител.

Второй тип Ig-рестриктированных Т-хелперов установили Джейнуэй и др. [37, 46, 47]. Они обнаружили, что образование антител у облученного реципиента, которому было введено определенное количество примированных гаптенем В-клеток и лимитирующее число Т-клеток, специфичных к носителю, прямо зависит от дозы Т-хелперов. График зависимости количества антител от числа Т-клеток в логарифмической шкале (log-log) имеет вид прямой линии с наклоном значительно больше 1 ($1,67 \pm 0,5$). Если бы для антительного ответа была необходима только одна независимая (noninteracting) популяция Т-клеток, то наклон кривой при такой зависимости должен был быть равен 1. Следовательно, можно предположить, что в этой системе титруются две дополняющие друг друга популяции Т-хелперов. Одна из этих двух популяций Т-хелперов отсутствовала у мышей с агаммаглобулинемией, вызванной неонатальной супрессией антителами против μ -цепей Ig, хотя активность МНС-рестриктированных CTh сохранялась. В серии экспериментов Джейнуэй и др. охарактеризовали этот новый тип хелперных Т-клеток (Th2 по их терминологии) как клетки, которые кроме номинального антигена распознают детерминанты Ig, в частности идиотипические. Боттомли и др. [48, 49] установили, что IgTh-клетки участвуют в регуляции доминантной экспрессии идиотипа T15 при ответе мышей BALB/c на фосфорилхолин (ФХ). Они показали, что IgTh-клетки, специфичные к идиотипу T15, не обнаруживаются у мышей-самцов F_1 (CBA/N $\times$ BALB/c), которые не отвечают на ФХ и не экспрессируют циркулирующего идиотипа T15 [48]. Поскольку Т-клетки самцов F_1 (CBA/N $\times$ BALB/c) не экспрессируют идиотипа T15, можно думать, что индукция клеток IgTh зависит от экспрессии идиотипа на В-лимфоцитах или циркулирующих Ig. Эти авторы предположили, что клетки IgTh являются субпопуляцией Т-хелперов с двойной специфичностью к антигену и антигенному рецептору (идиотипу) и что этот тип клеток является партнером МНС-рестриктированных CTh. Согласно данной гипотезе, IgTh распознает антиген, но взаимодействует только с теми В-лимфоцитами, которые экспрессируют определенные детерминанты Ig, в частности идиотип. Мак-Дугал и др. [41] показали, что Т-клетки Lyt-1+ при иммунизации *in vitro* в присутствии В-лимфоцитов гене-

пируют хелперные Т-клетки этого типа, характеризующиеся экспрессией антигена Qa-1. Неизвестно, идентичны ли эти клетки идиотип-специфическим, антиген-независимым хелперным Т-клеткам.

Другие исследователи [50] также обнаружили присутствие антиген-специфических Т-хелперов, которые преимущественно кооперируют с идиотип-положительными В-лимфоцитами. При совместном культивировании ограниченного числа поддерживаемых *in vitro* Т-хелперов, иммунных к гемоцианину (KLH), и примированных ФХ В-лимфоцитов определяли частоту Т-хелперов, индуцирующих Т15⁺- и Т15⁻-антительный ответ на ФХ. Полученные кривые титрования указывают, что KLH-специфические Т-хелперы, взаимодействующие с В-лимфоцитами Т15⁺ и Т15⁻, различны. Предполагается, что Т-клетки, специфичные для Т15-положительного ответа, специфичны также к KLH и что они соответствуют IgTh, описанным выше.

Другой тип идиотип-специфических Т-хелперов описали Вудлэнд и Кантор [51]. Мыши A/J, многократно иммунизированные конъюгатом арсонат (Арс)-KLH в полном адъюванте Фрейнда, образуют антитела против Арс, 20—70% которых несут перекрестнореагирующий идиотип (CRI) [52]. Популяция примированных KLH Т-хелперов Lyt-1⁺, из которой СRI-связывающие клетки были удалены адсорбцией на пластиковые чашках, покрытых экспрессирующими идиотип антителами против Арс, была способна кооперировать с примированными Арс В-лимфоцитами при образовании анти-Арс-антител *in vitro*. Однако при этом не наблюдалось образования CRI⁺ антител против Арс. При добавлении к этой культуральной системе нормальных Т-клеток Lyt-1⁺ способность продуцировать CRI⁺-антитела восстанавливалась, что свидетельствует о присутствии антиидиотипических Т-хелперов в популяции нормальных Т-лимфоцитов мышей A/J. Таким образом, для полного, включающего экспрессию CRI, антительного ответа мышей A/J на Арс необходимо взаимодействие хелперных Т-клеток двух типов, а именно CTh и IgTh (IdTh). Необходима ли такой IgTh-клетке антигенная стимуляция или нет, пока еще неизвестно, так как функцию эту способны выполнять и нормальные неиммунные, и иммунные к KLH Т-клетки. Следовательно, такие клетки могут присутствовать у нормальных животных, причем их активность не зависит от иммунной стимуляции Арс или CRI.

Другие сходные кооперирующие субпопуляции хелперных Т-клеток, специфичных к эпитопу и идиотопу, были обнаружены при ответе на белковые антигены. Как отмечает Серкарч и др. [53], особый интерес представляет антительный ответ на лизоцим куриного яйца (ЛКЯ). Эти авторы обнаружили, что два продукта расщепления ЛКЯ бромцианом, а именно пептиды N-C и LII, несут эпитопы, которые преимущественно стимулируют супрессорные и хелперные Т-клетки. В то время как пептид N-C индуцирует Т-супрессоры только у генетически неответающих мышей H-2^b, пептид LII индуцирует Т-хелперы у животных как отвечающей, так и неответающей линий. Антитела (и соответственно В-лимфоциты), специфичные к ЛКЯ, в основном направлены к N-части молекулы и характеризуются набором идиотипических детерминант, выявляемых антиидиотипическими антителами морских свинок. Эти исследователи разделили ЛКЯ-специфические и идиотип-специфические хелперные Т-клетки с помощью адсорбции на пластиковых чашках, покрытых антигеном и антителами против ЛКЯ (Id+Ig) соответственно [54]. В результате удаления IgTh образование идиотип положительных анти-ЛКЯ-антител резко снижалось, а при смешивании IgTh и CTh восстанавливался полный ответ на ЛКЯ. Из этих результатов следует, что для максимального антительного ответа В-лимфоцитов необходимы комплементарные идиотипические взаимодействия и опосредован-

ные антигеном когнатные взаимодействия. Хотя вышеприведенные примеры показывают, что сочетание сигналов от CTh и IgTh необходимо для генерации полного ответа В-клеток, остается неизвестным, передаются ли эти сигналы одной и той же В-клетке одновременно или последовательно. Не установлено, одна и та же или разные популяции В-лимфоцитов чувствительны к двум различным популяциям Т-хелперов. На рис. 18.3 изображены четыре различные модели взаимодействий В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов.

В отличие от наблюдений, указывающих на наличие антиидиотипических рецепторов IgTh, ряд работ свидетельствует об экспрессии идиотипических детерминант на хелперных Т-клетках (см. обзоры [55, 56]). Исследуя образование А5А-идиотипа у мышей А/Ж при ответе на стрептококк типа А, Эйхманн и сотрудники показали, что введение антиидиотипических антител индуцирует хелперные и супрессорные Т-клетки, экспрессирующие А5А-идиотип [55, 56]. Как известно, иммунизация мышей А/Ж углеводным компонентом клеточной стенки стрептококка типа А (А-СНО) индуцирует большое количество гомогенных антител, которые характеризуются экспрессией идиотипа, сцепленного с аллотипом Igh-I^c. Антиидиотипические антитела морских свинок, специфичные к А5А, были разделены на две фракции IgG₁ и IgG₂. Мыши, которым вводили анти-А5А-IgG₁, генерировали А-СНО-специфические хелперные клетки, которые кооперативно взаимодействовали с В-лимфоцитами при ответе на конъюгаты гаптена с антигеном стрептококка. В отличие от этого введение анти-А5А-IgG₂ вызывало образование А-СНО-специфических Т-супрессоров. Сообщалось также, что эти несущие идиотип А5А-Т-хелперы преимущественно

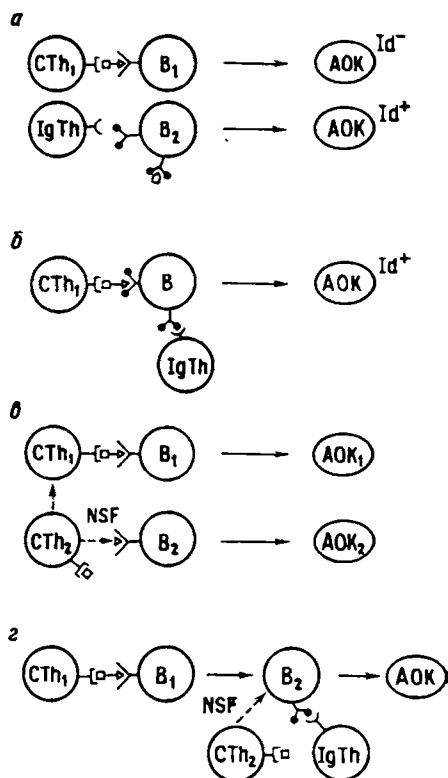


Рис. 18.3. Различные модели взаимодействий Т-хелперов и В-лимфоцитов.

а. CTh и IgTh, взаимодействующие с разными популяциями (Id⁺Id⁻) В-лимфоцитов. б. Необходимость и CTh, и IgTh для активации В-лимфоцитов Id⁺. в. Синергизм между CTh и IgTh. Популяции В-лимфоцитов, активируемые Т-хелперами этих двух типов, могут различаться. г. Модель двухэтапной дифференцировки В-лимфоцитов, требующая кооперации с Т-хелперами разных типов. Для запуска В-клеток необходимы CTh1, а для дальнейшей дифференцировки активированных CTh1 В-клеток в АОК необходимо действие CTh1 или IgTh.

взаимодействуют с А5А-идиотип-положительными В-лимфоцитами [56]. Было высказано предположение, что СTh и IgTh сосуществуют и последняя популяция хелперов дает селективный сигнал идиотип-положительным В-лимфоцитам.

18.3.3. МНС-рестрикция при взаимодействии Т-хелперов и В-лимфоцитов

Истинный механизм когнатной помощи, оказываемый клетками СTh1, в целом неясен. Получено, однако, несколько важных результатов, касающихся в основном когнатных взаимодействий между Т- и В-лимфоцитами, в которых важную роль играют молекулы МНС.

Киндред и Шреффлер [29] вводили тимоциты бестимусным (*nu/nu*) мышам с базовым генотипом линии BALB/c (*H-2^d*) для восстановления их иммунологической реактивности. Если использовались тимоциты сингенных мышей *nu/+* или мышей, совместимых по *H-2*, то животные давали высокий уровень антител против БЭ. Однако если донор тимоцитов отличался по гаплотипу *H-2*, то при переносе тимоцитов антительный ответ не восстанавливался.

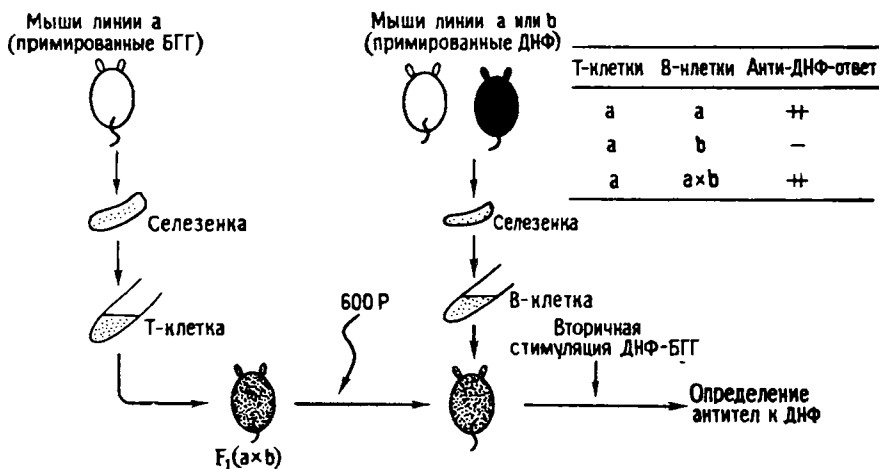


Рис. 18.4. Общая схема опыта по определению генетической рестрикции взаимодей-

вий между СTh и В-лимфоцитами. Детали см. в тексте. (По [30].)

Кац и сотрудники [30, 57, 58] провели тщательное исследование, чтобы выяснить, какие клетки иммунной системы контролируют генетическую рестрикцию (рис. 18.4). Они переносили клетки селезенки иммунных к носителю (БГГ) или неиммунизированных мышей родительской линии А реципиентам $F_1(A \times B)$, которых облучали спустя 24 ч после переноса. При этом удалялись Т-клетки, чувствительные к гамма-облучению. Примированные носителем Т-хелперы сравнительно устойчивы к облучению, и, следовательно, облученные реципиенты содержали БГГ-специфические клетки Th1. Затем животным вводили примированные к ДНФ-КЛН селезеночные В-лимфоциты родительской линии В, полученные обработкой суспензии анти-Th1 и комплементом (С). Животных-реципиентов вторично иммунизировали ДНФ-БГГ, чтобы проверить способность к когнатному взаимодействию между ДНФ-примированными В-клетками линии В и БГГ-примированными радиорезистентными Т-клетками линии А. Использование в этом эксперименте различных линий мышей, реком-

бинантных по локусу *H-2*, позволило однозначно картировать в *I-A*-субобласти гены, рестриктирующие взаимодействие Т- и В-лимфоцитов. Другими словами, эффективное взаимодействие Т- и В-лимфоцитов происходит только в том случае, если они обладают общими аллельными вариантами субобласти *I-A*, а комбинации клеток, отличающихся по субобласти *I-A*, не способны к кооперации.

На основе этих результатов была сформулирована концепция о существовании специальных генов, управляющих эффективными взаимодействиями клеток. Предполагалось, что в *MHC* имеются гены клеточных взаимодействий (гены *CI*), которые кодируют молекулы (молекулы *CI*), ответственные за осуществление клеточных взаимодействий [58]. По данным генетического картирования такие гены *CI* локализуются в основном в области *I* [58]. Отсутствие эффективной кооперации Т- и В-лимфоцитов, не совместимых по локусу *H-2*, может быть связано с отсутствием совместимых молекул *CI* на этих клетках. Природа молекул *CI* неизвестна. Кац [59] предположил, что в процессе дифференцировки Т- и В-лимфоциты экспрессируют молекулы *CI*, необходимые для взаимодействия по принципу «подобное с подобным», или по принципу комплементарности.

Нарушение кооперации клеток может быть вызвано также супрессией, обусловленной отрицательным аллогенным эффектом. Действительно, в некоторых экспериментальных системах *in vitro* комбинация несовместимых по *H-2* (аллогенных) Т- и В-лимфоцитов индуцирует отрицательный эффект, угнетающий суммарный ответ В-лимфоцитов (отрицательный аллогенный эффект). Сообщалось, что успешная кооперация клеток, несмотря на различия по *MHC*, все же происходит, если из популяции Т-клеток удалить клетки *Lyt-2⁺* или СКЛ-реактивные клетки [60]. Однако наличие аллогенных клеток не объясняет полностью отсутствие взаимодействий между клетками, несовместимыми по *H-2*, поскольку хелперные Т-клетки животных *F₁* и родительские В-лимфоциты, а также В-лимфоциты животных *F₁* и Т-клетки родительских линий могут взаимодействовать даже при наличии аллогенных эффектов [30].

Критическая проверка концепции *MHC*-рестрикции проводилась во многих лабораториях. Для устранения проблемы аллогенного эффекта использовалось несколько методов, с помощью которых можно предотвратить развитие алло-реактивных клеток или удалить уже имеющиеся. Один из подходов заключается в следующем. Получают костномозговые химеры при введении летально облученным гибридам *F₁* (*A* × *B*) стволовых клеток костного мозга линии с генотипом *A* или *B* [*A* или *B* → *F₁* (*A* × *B*) химеры] или смеси клеток с генотипом *A* и *B* [(*A* + *B*) → *F₁* (*A* × *B*)]. Исследовалась способность селезеночных Т-лимфоцитов таких химер взаимодействовать с В-клетками каждый из родительских линий и индуцировать антительный ответ. Дифференцировка стволовых клеток линии *A* или *B* в химерном микроокружении делает эти клетки взаимно толерантными. После обработки селезеночных клеток химер анти-сывороткой против антигенов линии *A* или *B* и комплементом определялась способность оставшихся Т-лимфоцитов генотипа *B* или *A* взаимодействовать с В-лимфоцитами второй линии, несовместимой по *H-2*. Результаты, полученные в разных лабораториях, указывали, что химерные Т-клетки типа *A*, дифференцирующиеся в реципиенте *F₁*, могут одинаково хорошо взаимодействовать с В-лимфоцитами линий *A* и *B* [61—65]. То же самое справедливо и в отношении Т-клеток типа *B*, дифференцирующихся в микроокружении *F₁* (*A* × *B*). Это свидетельствует о том, что специфичность рестрикции формируется во время антиген-независимой дифференцировки Т-клеток в *F₁*-микроокружении.

Сходные результаты получены в экспериментах с аллофенными (allophenic — от *allogenic phenotype*) мышами (агрегационными химерами) [66, 67]. Эти мыши были получены в результате слияния *in vitro* эмбрионов мышей двух различных линий на стадии 8 бластомеров и последующего созревания в матке самки любой из родительских линий. Мыши, полученные таким способом, являются естественными химерами двух различных линий, в которых Т- и В-лимфоциты обеих линий являются взаимно толерантными. Было четко показано, что несовместимые по локусу *H-2* Т- и В-лимфоциты таких аллофенных химер могут взаимодействовать даже в том случае, когда Т-клетки происходят от линий с низкой иммунореактивностью [66]. Таким образом, возникло предположение, что истинной генетической рестрикции нет, а существует лишь проявление эффектов, возникающих при смешивании аллогенных клеток, которые могут быть устранены при взаимной толерантности Т- и В-лимфоцитов.

Основываясь на данных о способности Т-клеток костномозговых химер кооперировать с В-лимфоцитами каждой из родительских линий, когда Т-клетки толерантны к МНС второй линии, Спрент и фон Бёмер [68] получили хелперные Т-клетки от летально облученных мышей $F_1(A \times B)$, которым вводили иммунные к БЭ клетки лимфоузлов родительской линии А или В. Такие хелперные Т-клетки, прошедшие «фльтрацию» в реципиенте F_1 , в основном лишены аллореактивных клеток, которые специфичны к гаплотипу МНС другой родительской линии и могут вызывать отрицательный аллогенный эффект. Клетки, прошедшие фильтрацию, переносили другим облученным реципиентам F_1 вместе с сингенными, семиаллогенными (F_1) и полностью аллогенными В-лимфоцитами другой родительской линии, а затем определяли способность этих клеток давать вторичный ответ на БЭ. В отличие от Т-клеток химер такие селектированные клетки были способны взаимодействовать с сингенными и В-клетками F_1 , но не с полностью аллогенными В-лимфоцитами другой родительской линии. Отсюда был сделан вывод, что удаления аллореактивных клеток недостаточно для кооперации аллогенных Т- и В-лимфоцитов. Чем объясняется такое расхождение результатов, полученных с Т-клетками химерных животных и «профильтрованными» Т-клетками, до конца еще не установлено. Предполагается, что генетическая рестрикция определяется первичной иммунизацией Т-клеток, поскольку Т-клетки активируются антигеном в контексте с молекулами МНС антиген-презентирующей клетки. Поскольку прошедшие фильтрацию Т-клетки были активированы в сингенном реципиенте до индукции толерантности к аллоантигенам, они приобрели специфичность рестрикции по сингенным молекулам МНС. В дальнейшем это подтвердили Капплер и Мэррак [62], показав, что F_1 -хелперные Т-клетки, примированные *in vivo* введением нагруженных антигеном макрофагов родительской линии, преимущественно кооперировали с В-лимфоцитами той же самой, но не второй родительской линии. Эти результаты указывают, что специфичность рестрикции определяется не только во время антиген-независимого этапа дифференцировки, но также и во время примирования клеток антигеном.

У химер Т-клетки родительской линии А в реципиенте $F_1(A \times B)$ узнают антиген в ассоциации с молекулами МНС антиген-презентирующих клеток линий А и В. Следовательно, активируются клоны Т-хелперов, способные кооперировать с В-лимфоцитами гаплотипов А, и В [69]. Спрент и сотрудники также исследовали влияние продуктов генов *H-2* на функцию хелперных Т-клеток нормальных и химерных мышей, в зависимости от влияния микроокружения в ходе дифференцировки и активации антигеном. Т-клетки нормальных и химерных мышей переносили облученным реципиентам вместе с антигеном (БЭ). Донорские клетки собирали из грудного лимфатического

протока реципиентов спустя 1—2 и 5—6 дней после переноса. Т-В-кооперация оценивалась с помощью переноса «отобранных» клеток грудного лимфатического протока и иммунных к БЭ В-лимфоцитов облученным мышам, которых затем иммунизировали БЭ. В популяции клеток грудного лимфатического протока, взятых на 1-й и 2-й день, отсутствовали БЭ-реактивные лимфоциты, которые задерживаются в лимфоидных органах (отрицательная селекция). Клетки, полученные на 5-й и 6-й день после переноса, были обогащены БЭ-реактивными клетками в результате выхода бластных клеток в кровоток (положительная селекция). Довольно простые «правила» *H-2*-рестрикции суммированы в табл. 18.1. Из этих данных вытекают следующие важные положения: а) эффек-

Таблица 18.1. Корреляция между рестрикцией Т-хелперной функции и средой дифференцировки и селекции Т-клеток

Т-клетки	Молекулы МНС, представленные при дифференцировке Т-клеток	Реципиент, в котором были примированы Т-клетки	Ответ на БЭ в кооперации с В-лимфоцитами мышей		
			А	В	F ₁ (A×B)
Нормальные					
А	А	F ₁ (A×B)	+	—	+
В	В	F ₁ (A×B)	—	+	+
F ₁ (A×B)	А и В	А	+	—	+
F ₁ (A×B)	А и В	В	—	+	+
F ₁ (A×B)	А и В	F ₁ (A×B)	+	+	+
Химерные					
F ₁ (A×B) → А	А	F ₁ (A×B)	+	—	+
F ₁ (A×B) → В	В	F ₁ (A×B)	—	+	+
А → F ₁ (A×B)	А и В	F ₁ (A×B)	+	+	+
А → F ₁ (A×B)	А и В	А	+	—	+
А → F ₁ (A×B)	А и В	В	—	+	+

тивные взаимодействия Т-хелперов с В-лимфоцитами данного гаплотипа *H-2* прежде всего зависят от присутствия этих детерминант *H-2* на ранних этапах дифференцировки; б) у химер, когда Т-клетки могут взаимодействовать с В-лимфоцитами родительской линии А и В, существуют два вида независимых клонов с функциональной рестрикцией по молекулам МНС линий А и В; в) Т-клетки животных F₁, которые дифференцировались в реципиенте одной из родительских линий, эффективно взаимодействовали с В-лимфоцитами этой линии, но не были способны стимулировать В-лимфоциты другой родительской линии и г) клоны, рестриктированные по молекулам МНС линий А и В, можно получить с помощью положительной селекции в микроокружении, в котором Т-клетки примирются антигеном, презентированным на поверхности макрофагов. Вальдман и др. [73] также конструировали тимусные химеры с помощью летального облучения тимэктомированных мышей F₁ и дальнейшей пересадки им сингенного костного мозга, из которого были предварительно удалены Т-лимфоциты, и тимуса одной из родительских линий. Хелперные Т-клетки этих химер, примированные в микроокружении F₁, кооперировали только с В-лимфоцитами, сингенными по отношению к донору тимуса. Эти результаты согласуются с гипотезой, согласно которой микроокружение, в котором происходит дифференцировка Т-лимфоцитов, контролирует специфичность рестрикции Т-хелперов так же, как и в случае Т-лимфоцитов, ответственных за опосредованную клетками лимфоцитотоксичность (ОКЛ, СМЛ) [74, 75], а также Т-

клеток, участвующих в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [76].

Кац [59] предложил концепцию, обобщающую эти на первый взгляд противоречивые наблюдения и получившую название «адаптивной дифференцировки» специфичности рестрикции. Эта концепция предполагает, что лимфоциты могут обучаться соответствующему фенотипу распознавания «своего», которое необходимо для участия в процессах клеточных взаимодействий, на основе CI-фенотипа той среды, в которой происходит начальная дифференцировка лимфоцитов, не ограничивающаяся одним тимусом. Можно индуцировать как у Т-, так и у В-лимфоцитов экспрессию фенотипа, обеспечивающего предпочтительную кооперацию с той или иной клеткой-партнером, в зависимости от условий, в которых такие лимфоциты проходят определенные стадии дифференцировки [77—79]. Если это так, то генетическая рестрикция как распознавание «своего» крайне пластична и в процессе дифференцировки селективируются лишь клетки, несущие соответствующие молекулы CI. Однако преждевременно обсуждать, картируются ли сами гены CI в области I или нет, поскольку они не обязательно должны быть продуктами именно этой области, а могут лишь представлять структуры, которые только «видят» продукты области I, являясь сами продуктами генов другой хромосомы.

Все рассмотренные выше данные все же крайне противоречивы, и для их подтверждения необходима дальнейшая экспериментальная работа. Один из вопросов заключается в том, является ли видимая рестрикция взаимодействия Т-хелперов и В-лимфоцитов лишь побочным эффектом хорошо известной жестко заданной рестрикции взаимодействия макрофагов и Т-клеток. Ямашита и Шевах [80] селектировали хелперные Т-клетки морских свинок F₁ (2 × 13) по способности адсорбироваться на нагруженных антигеном макрофагах одной или другой родительской линии. Они обнаружили, что Т-клетки, селектированные с помощью макрофагов линии 2, кооперируют с В-лимфоцитами линии 2, но не линии 13 независимо от того, являлись ли источником антиген-презентирующих клеток нагруженные антигеном макрофаги линии 2 или линии 13. Этот и другие эксперименты свидетельствуют о том, что наблюдаемая рестрикция определяется не взаимодействием макрофаг — Т-хелпер, а действительно проявляется на уровне кооперации Т- и В-лимфоцитов.

Наконец, можно рассмотреть еще одну возможность. Не исключено, что Т- и В-лимфоциты функционально гетерогенны и в отдельных экспериментах выявляются лишь те или иные субпопуляции. Как уже обсуждалось, существует более двух типов хелперных Т-клеток, чье воздействие на В-лимфоциты опосредуется разными механизмами. Эксперименты Зингера и др. [81] свидетельствуют о том, что для двух субпопуляций В-лимфоцитов, различаемых по маркерам L_уb-5, необходимы разные типы Т-клеточной помощи. В-лимфоцитам L_уb-5⁻ необходимы хелперные Т-клетки, распознающие детерминанты МНС-молекул В-лимфоцитов, тогда как В-клетки L_уb-5⁺ можно активировать антиген-неспецифическими Т-клеточными медиаторами без всяких ограничений по МНС (рис. 18.3). Таким образом, существует, по-видимому, два типа В-лимфоцитов, у которых генетическая рестрикция взаимодействий с хелперными Т-клетками более чем двух видов различна.

Итак, МНС-рестрикция при Т-В-взаимодействиях, хотя и вызывает противоречивые суждения, но имеет чрезвычайно важное значение для изучения клеточных взаимодействий. Здесь мы сталкиваемся с двумя основными проблемами: а) пластичностью специфичности МНС-рестрикции, которая зависит от окружения как на ранней антиген-независимой стадии дифференцировки Т-клеток, так и на стадии примирования их антигеном, презентированном на

специализированных макрофагах, б) гетерогенностью Т-хелперов и В-лимфоцитов, которым необходимы различные генетически заданные условия дифференцировки и активации. Кроме того, эту проблему следует рассматривать в свете хорошо известного спора о природе Т-клеточного рецептора, а именно: следует ли отдавать предпочтение модели, предусматривающей наличие только одного участка связывания, или модели, постулирующей существование двух таких участков. Эти проблемы указывают на значительно большую, чем первоначально предполагалось, сложность клеточных взаимодействий и свидетельствуют о том, что распознающая структура Т-клетки, специфичная и к антигену, и к «своему» (молекуле Ia), может формироваться в результате крайне необычного способа экспрессии генов именно в плане его адаптивности. И хотя у нас нет еще определенных ответов на рассмотренные вопросы, мы раскрываем здесь уникальный процесс адаптивной дифференцировки, который характерен только для иммунной системы.

18.4. Генерация хелперных Т-клеток

До взаимодействия с В-лимфоцитами Т-клетки, находящиеся в интерфазе, должны быть сначала простимулированы антигеном, чтобы в результате пролиферации и дифференцировки перейти в активированное состояние. Оптимальный пролиферативный ответ Т-клеток и индукция активных Т-хелперов происходит только в том случае, если антиген представлен собственными вспомогательными клетками (макрофагами и т.д.). Общее облучение животного приводит через 2—3 дня к краткосрочной инактивации функции макрофагов, и индукция хелперных Т-клеток значительно подавляется, если антиген вводится в течение этого периода. Более того, истощение селезеночных клеток, прикрепляющихся к стеклу, ведет к удалению вспомогательных клеток, необходимых для активации хелперных Т-лимфоцитов *in vitro*.

Необходимость в макрофагах для Т-клеточной активации не может быть целиком отнесена ни за счет их фагоцитирующей активности, ни за счет способности переваривать и процессировать антиген. Исследованиями, проведенными в разных лабораториях, было показано, что способность макрофагов стимулировать Т-клетки связана, с одной стороны, с образованием антиген-неспецифического фактора (IL-1), стимулирующего Т-хелперы, а с другой стороны, с презентацией антигена в ассоциации с молекулами Ia. В общем, хелперные Т-клетки активируются только в том случае, если они распознают антиген в ассоциации с собственными молекулами Ia на антиген-презентирующих клетках. Во многих экспериментальных системах, в которых использовались белковые антигены или конъюгаты гаптен-носитель, показана необходимость совпадения по генам *MHC* макрофага и Т-клетки, в частности по субобласти *I-A* у мышей [31, 34, 82]. В некоторых системах, использующих такие синтетические полипептиды, как, например, L-глутаминовая кислота⁵⁶, L-лизин³⁵, L-фенилаланин⁹ (GLP), ответ на которые зависит от двух комплементирующих генов *I_H*, для максимальной стимуляции хелперных Т-клеток необходимо совпадение по субобластям и *I-A*, и *I-E/C* [83]. Обработка антиген-презентирующих клеток соответствующей антисывороткой против молекул *I-A* блокирует их антиген-презентирующую способность, отменяя генерацию функциональных Т-хелперов [84]. Некоторые исследователи обнаружили, что антисыворотки против *I-J* также блокируют способность макрофагов индуцировать первичный антительный ответ [85]. Как уже обсуждалось в гл. 15, функциональная рестрикция, наблюдаемая при активации Т-клеток макрофагами, подчиняется закономерностям, выведенным при исследовании генов *I_H* и блокирую-

щего действия антител против молекул Ia. Основные параметры генетической рестрикции взаимодействия макрофагов и Т-клеток те же, что и при взаимодействии Т- и В-лимфоцитов, и, следовательно, Т-клетка, встретившаяся с антигеном в контексте Ia-молекул макрофагов, будет преимущественно взаимодействовать с той же самой комбинацией антигена и молекул Ia на поверхности В-лимфоцитов [86].

Основная проблема, которую следует здесь рассмотреть, заключается в том, как антиген-специфические хелперные Т-клетки запускаются антигеном в сочетании с молекулой Ia. Хотя процесс дифференцировки Т-клеток, в результате которого формируется репертуар Т-клеточного распознавания, в настоящее время неясен, тем не менее известно, что Т-клетки, активные в отношении антигена в сочетании с собственными молекулами Ia, присутствуют в периферической популяции Т-лимфоцитов. Эрб и Фельдман [87], а также Эрб и др. [88] исследовали процесс взаимодействий макрофаг—Т-клетка в ходе генерации специфических хелперных Т-лимфоцитов. Они обнаружили, что макрофаги, инкубированные с антигеном, высвобождают растворимый фактор, названный GRF (от англ. genetically related factor), который индуцирует хелперные Т-клетки в отсутствие макрофагов. Активность GRF генетически рестриктирована таким образом, что Т-хелперы индуцируются лишь при условии, что GRF получен от макрофагов, которые по субобласти I-A идентичны отвечающим Т-клеткам. Было показано, что GRF представляет собой родственную Ia-антигену молекулу макрофагального происхождения, нековалентно связанную с иммуногенным фрагментом антигена, и имеет мол. массу $55\,000 \pm 3000$ Да. Однако в отношении GRF еще много неясности: не выяснены природа Ia-детерминант, число цепей, способ ассоциации антигенного фрагмента и молекул Ia, структура антигенного фрагмента, ассоциированного с GRF.

В пользу предположения об индукции Т-хелперов под действием GRF свидетельствует следующее наблюдение. Клетки антиген-специфической Т-хелперной гибридомы, полученной Лонай и др. [89], могут связывать антиген только в присутствии супернатанта культуры макрофагов. Лонай и др. постулировали, что для связывания антигена с антигенсвязывающим рецептором Т-клеток необходима ассоциация антигена и молекулы Ia макрофагов, сходная с той, которую предложили Эрб и Фельдман. Поскольку природа антиген-специфического рецептора Т-хелперов неизвестна, запускающий Т-клетку сигнал, который передается ассоциированным с макрофагами антигеном, предстоит еще исследовать.

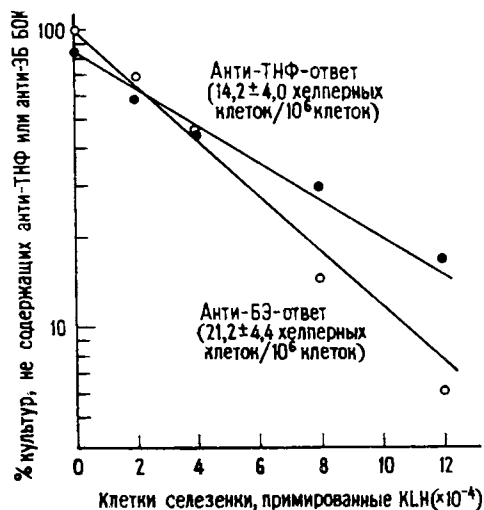
Кроме GRF существует ряд других неспецифических факторов макрофагального происхождения, влияющих на активацию Т-клеток. IL-1, ранее называемый «фактором, активирующим Т-лимфоциты» (TAF), является одним из факторов, стимулирующим активацию Т-хелперов [90]. Кроме того, активированные Т-клетки продуцируют факторы, которые в свою очередь помогают пролиферации, дифференцировке и созреванию других Т-клеток (IL-2). В дополнение к анализу сложной системы факторов, управляющих генерацией Т-хелперов, читателям следует учесть и влияние генов *Ig* на генерацию хелперных Т-лимфоцитов (см. гл. 16).

18.5. Частота предшественников хелперных Т-лимфоцитов

Анализ методом лимитирующих разведений дает важную информацию о качестве и количестве хелперных Т-клеток, активированных в различных условиях; он позволяет не только оценить приблизительную частоту клеток-

предшественников, которые под действием различных стимулов дифференцируются в хелперные Т-клетки, но также и проанализировать разные типы хелперных Т-клеток на уровне одной клетки. Например, Мэррак и Капплер [38] исследовали методом лимитирующих разведений гетерогенность КЛН-специфических Т-хелперов. Примированные КЛН Т-клетки культивировали в условиях предельных разведений с избытком В-лимфоцитов, примированных БЭ или ТНФ-БСА. Смесь клеток стимулировали ТНФ-КЛН (для индукции когнатной помощи) и БЭ, чтобы оценить поликлональный хелперный эффект, вызванный посторонними БЭ-специфическими В-лимфоцитами. Культуры оценивались как положительные или отрицательные в зависимости от их ответа на БЭ или ТНФ.

Рис. 18.5. Анализ методом лимитирующих разведений частоты специфичных к КЛН СTh1 и СTh2, участвующих в хелперных взаимодействиях при антительном ответе на ТНФ-КЛН и БЭ [38].



С увеличением числа добавленных Т-клеток, примированных КЛН, число культур, неспособных к ответу, уменьшалось. С помощью статистического анализа линейной зависимости числа неспособных к ответу культур от числа добавленных КЛН-специфических Т-клеток (оба значения выражены как $\log_{10}$) можно рассчитать частоты Т-хелперов для ТНФ-специфических В-лимфоцитов (при когнатной помощи) и для БЭ-специфических В-лимфоцитов (при неспецифической помощи) (рис. 18.5). В результате такого анализа были сделаны два вывода. Во-первых, они установили, что примированные клетки селезенки содержат Т-хелперы, способные в присутствии КЛН стимулировать ответ В-лимфоцитов и на ТНФ-КЛН, и на БЭ, и б) во-вторых, с помощью метода предельных разведений они показали, что КЛН-специфические хелперные Т-клетки, способные кооперировать с В-лимфоцитами в ответе на ТНФ-КЛН (СTh1), отличаются от КЛН-специфических Т-клеток, способных кооперировать с В-лимфоцитами при ответе на БЭ (СTh2). Оценка частоты КЛН-специфических СTh1, которые помогают В-лимфоцитам отвечать на ТНФ-КЛН, дала 7—15 клеток на 10^6 Т-клеток, примированных КЛН. С другой стороны, частота КЛН-специфических Т-клеток, кооперирующих в присутствии КЛН с В-лимфоцитами, специфичными к постороннему антигену БЭ, составила от 12 до 29 на 10^6 Т-клеток, примированных КЛН. Мэррак и Капплер [38] установили, что частота КЛН-специфических СTh2 почти всегда была выше частоты Т-клеток (СTh1), способных кооперировать с В-лимфоцитами при ответе на ТНФ-КЛН.

Вальдман и сотрудники [92—95] также провели серию экспериментов, в которых методом лимитирующих разведений исследовали функцию радиорези-

стентности Т-хелперов. В результате совместного культивирования популяции иммунных к ТНФ- В-лимфоцитов, из которых были удалены Т-клетки, и ограниченного числа облученных Т-клеток, лишенных В-лимфоцитов, эти исследователи пришли к следующим выводам: а) существуют два типа Т-В-взаимодействий, а именно специфическое (когнатная помощь) и неспецифическое (поликлональная помощь); б) специфические хелперные Т-клетки являются «моноклонными» в том смысле, что одна хелперная Т-клетка может взаимодействовать только с одним В-лимфоцитом, который продуцирует антитела определенного изотипа и специфичности; в) неспецифические хелперные Т-клетки в отличие от специфических способны взаимодействовать по меньшей мере с двумя В-лимфоцитами; г) специфическая хелперная клетка рестриктирована по H-2, тогда как неспецифический хелперный эффект вызывают МНС-нерестриктированные хелперные факторы. Рассчитанная частота БЭ-специфических хелперных Т-клеток, индуцирующих первичный ответ на БЭ, составляла 1 на 12 500 клеток ($8/10^5$). Частота Т-клеток, участвующих в неспецифической кооперации при развитии ответа на эритроциты осла (ЭО), была в два раза меньше. В случае клеток селезенки, примированных KLH, вычисленная частота специфических Т-хелперов при ответе на ТНФ-KLH составляла $1/10^5$. Значительно более высокая частота KLH-специфических хелперных Т-клеток, способных в присутствии KLH неспецифически стимулировать ответ на БЭ, достигала $4/10^5$ (облученных) и $7/10^5$ (необлученных) клеток селезенки, стимулированных KLH.

Эйхманн и др. [96] исследовали частоту предшественников в популяции иммунных Т-клеток селезенки методом лимитирующих разведений. В этих экспериментах Т-клетки были стимулированы конканавалином А и культивировались в среде, содержащей IL-2 (фактор роста Т-клеток, TCGF), для последующего анализа частоты хелперных Т-клеток в этой неиммунной, поликлональной, активированной Т-клеточной популяции. Ограниченное число Т-клеток, выросших в этих условиях, затем культивировали с В-лимфоцитами в присутствии специфического антигена, ТНФ-модифицированных бактерий стрептококка А и определяли зависимость числа положительных культур, образующих антитела против ТНФ, от числа внесенных Т-клеток. При определении частоты предшественников Т-хелперов, специфичных к стрептококку А, статистический анализ показал два различных распределения, так что были построены две кривые. Данные анализа с использованием различных концентраций Т-клеток мышей А/Ж и А.SW представлены на рис. 18.6. Значения частоты предшественников, полученные при добавлении большего количества Т-клеток, составили 1 на 15 000 клеток ($7/10^5$) для А.SW и 1 на 30 000 клеток ($3/10^5$) для А/Ж. Если же добавлялось малое число Т-клеток порядка 10^3 клеток на культуру, установленная частота Т-хелперов была равна $1/1500$ ($7/10^4$) для А.SW и $1/3000$ ($3/10^4$) для А/Ж. Доля положительных культур снижалась с увеличением числа добавленных Т-клеток, что говорит о влиянии супрессорных клеток. Таким образом, эти данные продемонстрировали наличие двух субпопуляций хелперных Т-клеток, специфичных к стрептококку А: популяции Т-клеток, встречающейся с высокой частотой, и популяции Т-клеток, встречающейся с низкой частотой. Клетки первой популяции оказались Lyt-1, 2, 3⁺ и были представлены с частотой $1/1000$ — $1/6000$ у мышей А/Ж, А.SW и гибридов F₁ данных линий. Эти хелперные Т-клетки чувствительны к влиянию Т-супрессоров. Редко встречающиеся Т-хелперы относились к субпопуляции клеток Lyt-1⁺ и присутствовали с частотой от $1/10\ 000$ до $1/70\ 000$. Эти последние хелперные Т-клетки были нечувствительны к действию супрессорных клеток. Авторы постулировали, что популяция, встречающаяся с высокой частотой, содержит предшественники первичных хелперных клеток, тогда как популяция, встре-

чающаяся с низкой частотой, содержит хелперные Т-клетки памяти, уже активированные антигеном. Они предположили, что некоторые из часто встречающихся Т-хелперов в действительности являются идиотип-специфическими, а не антиген-специфическими. Неспецифические хелперные Т-клетки в этой экспериментальной системе не выявлялись. Уотсон [97] также использовал систему микрокультивирования, в которой СTh наращивали в присутствии

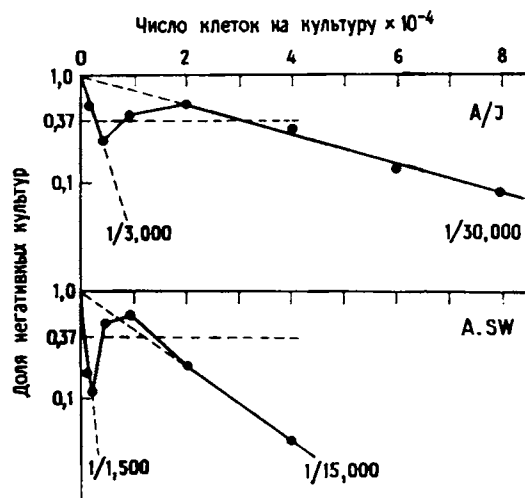


Рис. 18.6. Анализ методом лимитирующих разведений частоты Т-хелперов, кооперирующих с В-лимфоцитами при ответе на ТНФ-стрептококк А.

Т-клетки, активированные Кон А, выращивали в течение недели в присутствии фактора роста Т-клеток и определяли хелперную активность при культивировании ограниченного числа Т-клеток с В-лимфоцитами в присутствии конъюгата ТНФ-стрептококк А. Теоретические основы метода и сделанные выводы описаны в тексте.

фактора роста Т-клеток с последующим совместным культивированием с клетками селезенки бестимусных мышей. Он обнаружил независимую индукцию Т-хелперов с различной МНС-рестрикцией.

Спровиерио и др. [98, 99] исследовали различные типы хелперных влияний с помощью аналогичного метода лимитирующих разведений. Они обогащали СTh, стимулируя клетки *in vitro* антигеном (КЛН) в течение 18 дней. Им удалось различать два вида СTh, независимо кооперирующие с ДНФ-специфическими и ФХ-специфическими В-лимфоцитами в присутствии ДНФ-КЛН и ФХ-КЛН соответственно. Частота СTh, взаимодействовавших с ДНФ-специфическими В-лимфоцитами, была значительно выше, чем частота СTh, взаимодействующих с ФХ-специфическими В-лимфоцитами. Кроме того, обнаружены две популяции СTh, кооперирующие с ФХ-специфическими В-лимфоцитами при индукции Т15-идиотип-положительного и Т15-идиотип-отрицательного ответов у мышей линии А/Ж. Далее они показали, что с помощью данного метода можно различать СTh мышей F₁, рестриктированные по детерминантам молекул МНС родительских гаплотипов, а также по уникальным гибридным F₁-детерминантам.

Рассмотренные данные говорят о том, что популяция Т-клеток значительно сложнее, чем мы вначале предполагали, исходя из простой схемы Т-В-взаимодействий. Из этого следует, что нам необходимо проанализировать разные стороны регуляторных клеточных взаимодействий. Примечательно, что с помощью метода лимитирующих разведений удалось выявить различные популяции хелперных Т-лимфоцитов, которые независимо оценивались на уровне одной клетки. Этот метод дает возможность анализировать динамику клонального репертуара хелперных Т-клеток. Полученные результаты указывают на существование различных популяций Т-хелперов, взаимодействия с которыми существенны для наблюдаемого суммарного воздействия на ответ В-лимфоцитов. Эти

популяции включают специфические и неспецифические СTh, «моногамные» и «полигамные» СTh, первичные Т-хелперы и хелперные Т-клетки памяти, идиотип-специфические и идиотип-неспецифические хелперные Т-хелперы, различающиеся рестрикцией по области I, Т-хелперы, преимущественно взаимодействующие с В-лимфоцитами разной специфичности и изотипа. В том, какова истинная природа событий, происходящих при взаимодействии, и их взаимосвязь, пока еще много неясного. Важно, однако, проанализировать клональную структуру и дифференцировку этих различных популяций Т-хелперов, поскольку их динамический баланс, находящийся под влиянием супрессивных и стимулирующих воздействий других субпопуляций Т-клеток, может определять физиологическую структуру регуляторной системы Т-клеток.

18.6. Молекулярная основа хелперных взаимодействий: хелперные и усиливающие Т-клеточные факторы

18.6.1. Неспецифические хелперные факторы, продуцируемые СTh2

СTh2 определяется как тип клеток, который в присутствии одного антигена стимулирует ответ В-лимфоцитов на другой, неперекрестно-реактивный антиген. Даже при условии независимой стимуляции В- и Т-лимфоцитов детерминантами гаптена и носителя, представленными на двух разных молекулах, можно индуцировать образование антител гаптен-специфическими лимфоцитами. Хелперные Т-клетки, специфичные к БЭ, могут кооперировать с В-лимфоцитами, которые специфичны как к БЭ, так и к эритроцитам лошади (ЭЛ), если оба антигена присутствуют в культуральной системе (эффект «свидетеля») [110]. Эта неспецифическая или поликлональная помощь обусловлена, однако, специфическим взаимодействием Т-клеток с антигеном, должным образом презентированным макрофагами. Специфическая антигенная стимуляция Т-клеток при индукции неспецифической кооперации в некоторых случаях может быть заменена определенными митогенами [фитогемагглютинином (ФГА) или конканавалином А] или аллогенными клетками. При кооперации такого типа запуск В-лимфоцитов объясняется высвобождением Т-клетками антиген-неспецифических факторов. Хотя некоторые исследователи утверждают, что эффект «свидетеля» преимущественно направлен на сингенные В-лимфоциты [100], в принципе нет жесткой МНС-рестрикции поликлональных хелперных влияний.

По сообщениям ряда исследователей неспецифические растворимые факторы, высвобождаемые активированными Т-клетками, опосредуют некогнатную помощь Т- и В-лимфоцитов [101—106]. Описано по меньшей мере пять типов факторов: а) неспецифический медиатор (НСМ, NSM), высвобождаемый Т-клетками при стимуляции соответствующим антигеном [92, 104, 105]; б) аллогенный фактор (АФ, AEF), продуцируемый Т-клетками при аллогенной стимуляции (смешанная культура лимфоцитов, СКЛ); в) фактор, замещающий Т-клетки (ТЗФ, TRF), или фактор дифференцировки Т-клеток (ФДТ, TCDF), индуцируемый при стимуляции Т-клеток в СКЛ, а также конканавалином А или антигеном [101, 107—109]; г) фактор роста и созревания В-лимфоцитов (ФРС В-клеток, BRMF) также представляет собой фактор, полученный из клонированной Т-клеточной линии. ФРС В-клеток, вероятно, относится к группе В-клеточных факторов созревания позднего действия;

д) фактор роста В-лимфоцитов (BCGF), продуцируемый некоторыми Т-клеточными линиями [108, 121]. Дифференцировка-созревание индуцируется у некоторых, но не у всех В-лимфоцитов в результате взаимодействия этих факторов, секретируемых Т-клетками хелперного ряда. В данном разделе мы рассмотрим некоторые общие свойства лишь небольшого числа наиболее хорошо изученных факторов.

18.6.1.1. Неспецифические медиаторы

Неспецифические медиаторы представлены, вероятно, не одной, а целым набором различных молекул, по существу оказывающих одинаковое действие на образование антител *in vitro*. Одно из наиболее ранних наблюдений показало, что примированные Т-клетки при стимуляции антигеном могут оказывать хелперное действие (эффект «свидетеля») на В-лимфоциты, отвечающие на посторонний антиген [110]. Даттон и др. [25] первыми показали, что культуральная жидкость от смеси аллогенных клеток обладает активностью, заменяющей хелперные Т-клетки при первичном антительном ответе *in vitro* на БЭ. Исходя из этого, они выдвинули гипотезу о роли неспецифических растворимых медиаторов в кооперации Т- и В-лимфоцитов. Дальнейшие эксперименты продемонстрировали способность супернатантов культур примированных Т-клеток, стимулированных антигеном, аллогенными клетками или митогенами, усиливать антительный ответ лишенных Т-лимфоцитов клеток селезенки на растворимые и корпускулярные антигены. Как правило, эти факторы обладают активностью только в случае добавления в культуру в начале антигенной стимуляции (факторы раннего действия). Вероятно, в связи с множественностью и гетерогенностью неспецифических медиаторов их биохимические свойства изучены пока недостаточно.

18.6.1.2. Фактор аллогенного эффекта

Фактор аллогенного эффекта (АФ, АЕФ) впервые описали Армердинг и Кац [106] как активное начало, воспроизводящее наблюдаемый *in vivo* аллогенный эффект. Этот фактор получен в супернатантах культур после повторной стимуляции *in vitro* Т-клеток, примированных аллоантигеном, облученными клетками селезенки, экспрессирующими соответствующий аллоантиген. Фактор может заменять хелперные Т-клетки при вторичном анти-ДНФ-ответе популяции сингенных клеток селезенки, из которой были удалены Т-лимфоциты [106]. Фактор аллогенного эффекта с мол. массой от 30 до 45 кДа состоит из двух субъединиц (40 и 12 кДа). Активность фактора почти полностью истощается на иммуносорбентах, содержащих антитела к молекулам Ia или к β_2 -микроглобулину. Поскольку обычные молекулы Ia не ассоциированы с β_2 -микроглобулином, фактор аллогенного эффекта, вероятно, характеризуется структурой, отличной от обычных молекул МНС класса II. Имеются данные о том, что действие АЕФ рестриктировано по области I, причем он стимулирует только те В-лимфоциты, которые экспрессируют антиген Ia, использованный исходно для активации Т-клеток-продуцентов. Дидович и Мак-Девитт [111] показали, однако, что в однонаправленной реакции СКЛ продуцируется АЕФ двух типов. Один из них, вероятно, высвобождается отвечающей Т-клеткой и прямо действует на В-лимфоциты независимо от совместимости по МНС, тогда как другой, рестриктированный по МНС, продуцируется облученными В-лимфоцитами-стимуляторами, несущими обычные молекулы Ia. Таким образом, значение первоначально описанного АЕФ для физиологических взаимодействий Т- и В-лимфоцитов вызывает некоторые сомнения.

18.6.1.3. Фактор, заменяющий Т-клетки, или фактор дифференцировки В-лимфоцитов

Как исходно показали Шимпле и Веккер [101], фактор, замещающий Т-лимфоциты (TRF, ТЗФ), представляет собой фактор, обнаруженный в супернатантах 24-часовой смешанной культуры лимфоцитов, обладающий способностью восстанавливать *in vitro* антительный ответ клеток селезенки бестимусных мышей на БЭ. Сходный фактор, способный заменять Т-клетки, был получен из супернатантов культур непримированных клеток селезенки, стимулированных соответствующей дозой конканавалина А или антигена [112]. ТЗФ, по-видимому, продуцируется клетками Lyl1+2. - Хелперное действие, оказываемое ТЗФ, эффективно только на определенных стадиях В-клеточной дифференцировки, происходящей после антигенной стимуляции [101]. Первым указанием на это послужили следующие данные: оптимальный эффект давало добавление ТЗФ к культивируемым В-лимфоцитам на второй день, а не во время введения антигена (день 0). Было высказано предположение, что ТЗФ действует на пролиферирующие В-лимфоциты. Таким образом, дифференцировка В-лимфоцитов запускается антигеном и другими, отличными от ТЗФ медиаторами раннего действия и доходит до этапа, на котором В-клетки начинают экспрессировать рецепторы к ТЗФ (ТЗФ-акцепторы). Такие клетки под действием ТЗФ дифференцируются в антителообразующие клетки. Таким образом, ТЗФ можно рассматривать как один из факторов В-клеточной дифференцировки (В-ФД, BCDF). Такатсу и Хамаока [113] сообщили о наличии акцепторных участков для ТЗФ на стимулированных антигеном В-лимфоцитах и о сцепленном с Х-хромосомой контроле экспрессии акцепторных участков для ТЗФ. Существуют явные различия в биохимических и биологических свойствах ТЗФ, описанных разными исследователями, в отношении молекулярной массы, чувствительности к температуре, влияния на первичный и вторичный антительные ответы [112]. Например, описанный Такацу и Хамаокой [113] ТЗФ может активировать В-лимфоциты мышей СВА/Н — линии со сцепленным с Х-хромосомой иммунодефицитом, выражающимся в отсутствии В-лимфоцитов Lyb 3⁺ и Lyb 5⁺, тогда как ТЗФ, полученный Гринстайном и др. [114] у мышей СВА/Н неактивен. Сравнительно недавно был опубликован ряд сообщений об образовании ТЗФ и ТЗФ-подобных факторов клонированными Т-клетками и Т-гибридами [109, 113—116]. Этот, по-видимому, гомогенный материал, продуцируемый в большом количестве клонированными Т-клетками, позволит провести критический сравнительный анализ разных BCDF и их взаимоотношений.

18.6.1.4. Факторы репликации и созревания В-лимфоцитов

В основе рассматриваемой концепции лежит тот факт, что растворимый фактор Т-клеток способен стимулировать поликлональную пролиферацию и созревание активированных липополисахаридом (ЛПС) В-бластов в иммуноглобулин-секретирующие клетки [117, 118]. Этот фактор также продуцируется Т-клетками, примированными эритроцитами барана или лошади, при рестимуляции *in vitro* гомологичным антигеном [117]. Таким образом, образование фактора Т-клетками зависит от рестимуляции антигеном и МНС-совместимыми макрофагами, но сам секретированный фактор может стимулировать бластные В-лимфоциты как МНС-совместимых, так и МНС-несовместимых линий. Этот фактор (ФРСВ, BRMF) также получен из клонированных хелперных Т-клеточных линий, специфически стимулированных антигеном и МНС-совместимыми макрофагами [119, 120]. Мелчерс и сотр. [117—120] обнаружили интересные,

но противоположные эффекты в опытах с BRMF, продуцированным клонированными Т-клеточными линиями. В частности, этот фактор может индуцировать секрецию Ig только В-клетками в фазе G_1 клеточного цикла, вступивших в эту стадию в результате активации антигеном в сочетании с антиген-специфическим Ia-рестриктированным Т-клеточным сигналом. Фактор репликации и созревания В-лимфоцитов не индуцирует образования антител малыми покоеющимися В-лимфоцитами в фазе G_0 клеточного цикла. На основе этих данных было постулировано, что покоеющиеся В-лимфоциты могут быть активированы антигеном и антиген-специфическим Ia-рестриктированным фактором до стадии больших В-клеточных бластов в фазе G_1 , которые уже способны под действием BRMF пролиферировать и дифференцироваться в антителообразующие клетки. Обработка покоеющихся В-лимфоцитов BRMF в отсутствие антигена приводит к поликлональному

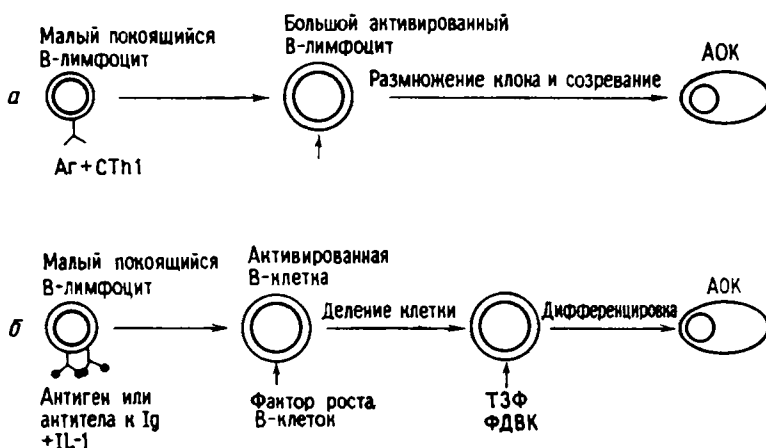


Рис. 18.7. Две модели В-клеточной дифференцировки при кооперативных взаимодействиях с Т-хелперами.

В обоих случаях для запуска В-лимфоцитов необходим специфический сигнал в сочета-

нии с CTh1 или IL1. В фазе G_1 клеточного цикла такие клетки становятся чувствительными к другим многочисленным медиаторам Т-клеточного происхождения.

созреванию клеток без пролиферации, причем этот ответ не рестриктирован по H-2 [120]. Эти результаты можно объяснить гетерогенностью BRMF, продуцируемых даже клонированными Т-клетками, и действительно, авторы работы получили клеточную линию, продуцирующую только фактор репликации В-лимфоцитов (BRF) [121]. Очевидно, что молекулы, обладающие функциональной активностью двух видов, продуцируются одним и тем же хелперным Т-клеточным клоном и действуют на В-лимфоциты на разных стадиях их дифференцировки (рис. 18.7, а). Покоящиеся В-лимфоциты можно активировать антигеном в ассоциации с собственными молекулами Ia на антиген-презентирующих клетках. После этой начальной фазы стимуляции В-клетки должны быть поликлонально активированы BRMF, чтобы приобрести способность к секреции антител. Хотя Андерсон и Мелчерс [120] идентифицировали молекулы двух разных видов — одни, специфичные к антигену, и другие, неспецифичные, — для выяснения связи этой модели с общим механизмом образования антител необходимы дальнейшие эксперименты.

18.6.1.5. Фактор роста В-лимфоцитов

С помощью недавно разработанного метода длительного культивирования В-лимфоцитов с Т-клеточными факторами удалось идентифицировать фактор, способный поддерживать рост В-лимфоцитов и необходимый для образования антител. Ховард и др. [108] обнаружили, что клеточная линия тимомы EL-4, стимулированная форболмиристатацетатом (ФМА), вырабатывает фактор, способный индуцировать поликлональную пролиферацию В-лимфоцитов, предварительно обработанных антителами против IgM или ЛПС. Фактором, продуцируемым клетками EL-4, оказался фактор роста В-клеток (BCGF). В отсутствие стимуляции антителами против IgM пролиферация В-лимфоцитов не индуцируется под действием этого фактора. Наконец, для индукции созревания антителообразующих клеток (АОК) необходима кооперация трех неспецифических факторов: BCGF и двух различных ТЗФ. Действие BCGF ограничивается усилением синтеза ДНК и не приводит к индукции образования антителообразующих клеток, пока не появятся два других фактора. При наличии этих дополнительных факторов фактор роста В-клеток является необходимым лимфокином для образования антиген-специфических АОК. Этот фактор отличается от других неспецифических Т-клеточных факторов, описанных ранее, а именно от интерлейкина 2, ТЗФ, колониестимулирующего фактора и BRMF. Число В-лимфоцитов, пролиферирующих в ответ на BCGF, соответствует числу всех В-клеток, способных активироваться антителами против Ig. Йошизаки и др. [122] обнаружили активность, подобную фактору роста В-клеток в супернатантах индуцированных антигеном хелперных Т-клеточных линий и Т-клеточных гибридом. Выказано предположение, что для эффективного действия BCGF необходима активация покоящихся В-клеток антителами против Ig, приводящая к экспрессии участков связывания BCGF, воспринимающих пролиферативный сигнал (рис. 18.7, б). Хотя эта модель очень похожа на модель, постулирующую активацию В-лимфоцитов неспецифическими факторами (рис. 18.7, а), следует подчеркнуть, что BCGF индуцирует только пролиферацию соответствующим образом стимулированных В-лимфоцитов и что для образования антител необходимо синергическое действие других факторов [123, 124]. Несмотря на то, что большинство IgM-несущих В-лимфоцитов может быть активировано BCGF после стимуляции антителами против IgM, при физиологических условиях, вероятно, нельзя недооценивать другой механизм В-клеточной активации, характеризующийся МНС-рестрикцией.

В конечном счете неспецифическая активация В-лимфоцитов Т-клетками представляет многоэтапный процесс, в котором участвуют различные лимфокины и монокины (рис. 18.7). Антиген-специфические, рецептор-специфические сигналы или лектины индуцируют у части, но не у всех В-лимфоцитов экспрессию рецепторов к неспецифическим Т-клеточным факторам. Эти Т-клеточные факторы с активностью, ограничивающейся некоторыми фазами В-клеточной дифференцировки, пролиферации и созревания, обеспечивают формирование антителообразующих клеток. Такие неспецифические медиаторы вовлечены в усиление, модификацию и регуляцию общего процесса, который определяет амплитуду и класс антительного ответа. Пока еще преждевременно обсуждать биохимические свойства этих многочисленных неспецифических Т-клеточных факторов и их различное действие на этапы дифференцировки В-лимфоцитов.

18.6.2. Антиген-специфические Т-хелперные факторы (ThF), продуцируемые Т-клетками, специфичными к носителю

Антиген-специфические Т-хелперные факторы были впервые обнаружены в супернатантах культур активированных Т-лимфоцитов, повторно стимулированных гомологичным антигеном. Сообщалось о двух основных типах ThF. Один фактор представляет собой молекулу, очень напоминающую по структуре мономерную форму IgM, и секретируется активированным антигеном Т-лимфоцитами [21, 215]. Предполагается, что эта молекула цитофильна по отношению к макрофагам и играет роль в фокусировании антигенных детерминант на поверхности В-лимфоцитов, что вызывает их активацию. Хотя этот фактор может объяснить многие стороны взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, велись долгие споры о том, продуцируют ли на самом деле обычные Т-хелперы подобные молекулы и является ли мономерный IgM (IgT) единственным «законным» медиатором Т-В-взаимодействий.

Тауссиг [126] первым сообщил о ThF неиммуноглобулиновой природы. Он получил «обученные» Т-клетки от реципиентов тимоцитов, иммунизированных синтетическим сополимером (Т, G)-А — L в полном адьюванте Фрейнда. «Обученные» Т-клетки затем были повторно стимулированы (Т, G)-А — L в бессывороточной среде. В супернатанте культуральной среды содержался растворимый медиатор, который при введении облученным мышам вместе с клетками сингенного костного мозга и соответствующим антигеном индуцировал образование антител против (Т, G)-А — L. Поскольку клетки костного мозга сами по себе не могли давать адоптивного антительного ответа, супернатант культур Т-клеток, иммунных к (Т, G)-А — L, по-видимому, заменял хелперное влияние специфических Т-лимфоцитов. Клетки, продуцирующие ThF относятся к Т-лимфоцитам Thy-1^+ , Lyt-1^+ . К наиболее примечательным свойствам этого антиген-специфического фактора относятся: а) способностью специфически связываться с антигеном; б) специфическая хелперная активность при ответе на (Т, G)-А — L, антиген, индуцирующий образование фактора; в) наличие антигенных детерминант, кодируемых в I-A-субобласти MHC; г) отсутствие детерминант структур константной области Ig; д) наличие определенной генетической рестрикции при взаимодействии фактора с отвечающими В-лимфоцитами. Эти свойства на первый взгляд согласуются с характеристиками, связанными с Т-хелперами, специфическими к носителю [126—128].

В дальнейших исследованиях Тауссиг и др. [128] и Мозес и др. [129] установили, что аналогичные факторы продуцируются в ответ на другие синтетические сополимеры аминокислот, ответ на которые контролируется генами *Ir*. Манро и Тауссиг [130] разработали модель специфического взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, контролируемого двумя *Ir*-генами. Они показали, что Т-клетки мышей с высокой ($H-2^b$) и низкой ($H-2^k$) реактивностью, стимулированные (Т, G)-А — L, продуцируют ThF, действие которого определялось *in vivo* на клетках костного мозга высокореактивной линии мышей. Клетки костного мозга низкореактивной линии не могли отвечать на антиген в сочетании с (Т, G)-А — L-специфическим фактором независимо от того, получен ли был фактор от линии животных с высокой или низкой реактивностью. Таким образом, дефект ответа на (Т, G)-А — L В-лимфоцитов мышей с низкой реактивностью связан с отсутствием «акцепторных участков» для (Т, G)-А — L-специфического ThF. Более того, неотвечающие линии B10.M ($H-2^d$) и A.SW($H-2^s$) характеризуются противоположным дефектом по сравнению с мышами $H-2^k$ в том смысле, что их Т-клетки не способны продуцировать (Т, G)-А — L-специфический ThF, но их В-лимфоциты могут отвечать на ThF других линий. Таким

образом, существуют по меньшей мере два типа дефектов экспрессии генов *I* γ при кооперации Т- и В-лимфоцитов: неспособность Т-клеток продуцировать (Т, G)-А — L-специфический ThF и неспособность В-лимфоцитов отвечать на ThF. Кроме того, у мышей SJL (*H*-2^s) нарушены как образование (Т, G)-А — L-специфического ThF, так и способность отвечать на него [129]. Если мышей линии B10.BR (*H*-2^b) с нарушенным ответом В-клеток скрестить с мышами линии B10.M с нарушенным ответом Т-клеток, то полученные гибриды F₁ будут способны и продуцировать (Т, G)-А — L-специфический ThF, и отвечать на него. Эти результаты указывают, что специфическая Т-В-кооперация контролируется двумя генами *MHC*, независимо регулирующими способность Т-клеток продуцировать и способность В-клеток отвечать на специфический ThF. Мыши линий A.SW и SJL, обе *H*-2^s, обнаруживают разные генетические дефекты, нарушающие либо образование, либо рецепцию ThF [(Т, G)-А — L. Эти наблюдения показывают, что, хотя образование и рецепция ThF в первую очередь определяются независимыми комплементирующими генами *MHC*, на них также влияют неизвестные «не-*MHC*»-гены (базового генотипа). Эта модель полностью отлична от *I* γ -генной комплементации при ответе на некоторые антигены (гл. 16), представляет другой пример генетического контроля клеточных взаимодействий.

Сходный антиген-специфический ThF можно индуцировать, культивируя нормальные клетки селезенки в присутствии соответствующих концентраций антигена (Т, G)-А — L в течение 4 дней [131]. Повышение концентрации антигена, напротив, индуцирует супрессорные Т-клетки [132]. Индуцированный таким способом хелперный Т-клеточный фактор может в отсутствие Т-клеток запускать первичный антительный ответ В-лимфоцитов на (Т, G)-А — L, а также на ДНФ — (Т, G)-А — L. Влияние ThF на В-лимфоциты осуществляется только в присутствии макрофагов. В действии индуцированного *in vitro* ThF на В-лимфоциты не обнаружено жестких генетических ограничений.

Существует ряд сообщений об индукции и характеристике ThF сходной природы, специфичных к синтетическим сополимерам, растворимым белкам и корпускулярным антигенам. С этими данными можно познакомиться в специальных обзорах [133—137]. Несмотря на значительные различия физико-химических и биологических характеристик этих ThF, все полученные результаты свидетельствуют о том, что специфические взаимодействия Т- и В-лимфоцитов могут, хотя бы отчасти, опосредоваться антиген-специфическими Т-клеточными продуктами, обеспечивающими когнатную активацию В-лимфоцитов. Некоторые из моделей постулируют, что ThF, являющийся цитотропным по отношению к макрофагам, фокусирует антигенные эпитопы на поверхности В-клетки [138]. Согласно этому представлению, детерминанты области I на ThF существенны для взаимодействия с макрофагами, но не с В-лимфоцитами (рис. 18.8, А). Согласно другой модели, ThF сам по себе обладает сродством к специализированному участку (акцепторному участку) на В-клетке (рис. 18.8, Б) и взаимодействие между фактором и В-лимфоцитом через антигенный мостик, а также фактор-акцепторное взаимодействие запускает В-клетку [130]. Фармакологические последствия этого взаимодействия пока еще не исследованы, но известно, что при таком взаимодействии в В-лимфоцитах повышается концентрация циклического АМР [139]. Существует также предположение, что антиген в свою очередь концентрирует и фокусирует функциональные участки молекулы фактора на акцепторных участках, что приводит к активации В-лимфоцита [140].

Опубликованы сообщения об успешном получении в ряде лабораторий Т-клеточных гибридом, продуцирующих антиген-специфические ThF [137]. К ним относятся специфичные к (Т, G)-А — L [141] и куриному гамма-глобули-

ну (КГГ) [142] ThF, продуцируемые клонированными гибридными линиями, которые были получены в результате слияния активированных Т-клеток с клетками тимомы BW5147. Хотя моноклональные Т-клеточные факторы по своим свойствам в основном сходны с ThF обычных активированных Т-клеток, необходимо иметь в виду, что: а) ThF несет детерминанты, перекрестно-реагирующие с каркасными участками V_H -области иммуноглобулинов; б) молекула состоит из двух полипептидных цепей: одной, несущей V_H , и другой, несущей продукты области $I-A$; в) в составе ThF, специфичного к $(T, G)-A-L$, выявляются идиотипические детерминанты и г) ThF, специфичный к белковому антигену (КГГ),

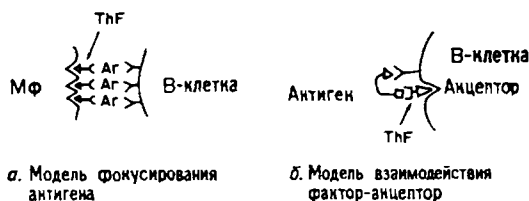


Рис. 18.8. Две модели действия антиген-специфических ThF.

а. Модель фокусирования антигена предполагает, что молекулы ThF цитотропны по отношению к мембране макрофага (МФ) и фокусируют молекулы антигена на иммуноглобулиновых рецепторах В-лимфоцитов.

б. Модель взаимодействия фактор-акцептор

предполагает, что антиген, связавшийся с Ig-рецептором, будет взаимодействовать с ThF и фокусировать фактор на акцепторных участках, специфических для ThF. Для активации В-клетки необходимы взаимодействия антигена с рецептором Ig и фактора с акцептором (два сигнала).

оказывает помощь только при взаимодействии с В-лимфоцитами, идентичными по субобласти $I-A$ (MHC -рестрикция), в отличие от ThF, специфичного к $(T, G)-A-L$, который взаимодействует с В-клетками, не совместимыми по локусу $H-2$.

Все эти наблюдения указывают на то, что ThF, вероятно, являются функциональными молекулами CTH и представляют секретированные Т-клеточные рецепторы, участвующие в когнатном взаимодействии между Т- и В-лимфоцитами. И снова для более глубокого изучения молекулярных механизмов когнатной помощи необходимы биохимические и молекулярно-генетические исследования.

18.6.3. Антиген-специфический усиливающий Т-клеточный фактор (TaF)

Этот фактор отличается от ранее упомянутых хелперных факторов, так как он обнаруживается в экстрактах КЛН-активированных Т-клеток и не заменяет хелперных Т-лимфоцитов. Вначале было обнаружено, что если экстракт Т-клеток, иммунных к КЛН, добавлять в начале культивирования, то он оказывает супрессирующее действие [143]. Однако Токухиза и др. [144] установили, что добавление этого экстракта к культивируемым клеткам селезенки, иммунным к ДНФ-КЛН, спустя два-три дня после антигенной стимуляции вызывает значительное усиление анти-ДНФ-ответа. Эти авторы охарактеризовали активное начало в экстрактах следующим образом. Во-первых, TaF не заменяет Т-клеток, так как одна смесь TaF, иммунных В-лимфоцитов (и макрофагов) и стимулирующего антигена не дает антительного ответа. Во-вторых, TaF представляет собой антиген-специфический фактор как по родству к антигену, так и по специфической способности усиливать антительный ответ на гаптены, конъюгированные с тем же носителем, который был исполь-

зован для генерации ТаF. В-третьих, ТаF отличается от ThF не только функцией, но и различием в способности некоторых линий мышей продуцировать ТаF, но не ThF. В-четвертых, ТаF содержит детерминанты области I, контролируемые геном субобласти I-A. Ia-детерминанты ТаF полностью отличаются от обычного В-клеточного Ia-антигена (антигены класса II). В-пятых, ТаF может усиливать антительный ответ линий, идентичных субобласти по I-A (по области I). В-шестых, ТаF действует на Т-, но не на В-лимфоциты. В-седьмых, его молекулярная масса не превышает 70 кДа. Наконец, ТаF получен из KLN-связывающих Lyt-1^+2^- -клеток.

Эти свойства были подтверждены анализом Т-клеточной гибридомы, продуцирующей ТаF [145]. К тому же с помощью моноклональных антител было обнаружено, что антиген Ia, ассоциированный с ТаF, отличается от любых других антигенов класса II. Как показали Шпурл и Оуэн [146], использовавшие моноклональные антитела, усиливающий Т-клеточный фактор гибридомного происхождения несет детерминанты каркасного участка цепи V_H и детерминанты гипотетической константной структуры Т-клеточного рецептора, которые экспрессируются индукторными Т-клетками (Tind^d). Детерминанты V_H и Tind^d представлены на полипептидной цепи, способной связывать антиген, тогда как детерминанты Ia представлены на отдельной цепи. Комбинация обеих цепей необходима для проявления антиген-специфического усиливающего эффекта.

Роль ТаF неизвестна. Как это будет рассмотрено ниже, он может индуцировать включение большего числа хелперных Т-клеток (индукторов Т-хелперов) в сложный усиливающий цикл клеточных взаимодействий. Усиливающий Т-клеточный фактор может быть зеркальным отражением супрессорного Т-фактора (TSF), модифицирующего суммарный ответ В-лимфоцитов изменением баланса супрессорных и хелперных сигналов.

18.7. Т-супрессоры

18.7.1. Общие соображения

Теперь мы познакомимся с принципиально другой функцией Т-лимфоцитов, называемых супрессорными Т-клетками (T_s). Функция Т-супрессоров в отличие от Т-хелперов начала привлекать внимание исследователей в конце 60-х — начале 70-х годов. Было отмечено, что прямое введение антигена в тимус вызывает специфическую супрессию иммунного ответа против того же самого антигена [147]. Гершон и Кондо [148] обнаружили, что индукция толерантности к большим дозам БЭ у мышей зависит от присутствия Т-клеток, и предположили, что Т-клетки играют определенную роль в супрессии антителообразования В-лимфоцитами. В дальнейших экспериментах они установили, что неспособность В-лимфоцитов к ответу на БЭ значительно выраженнее в присутствии Т-клеток [149]. Более того, состояние неответа можно специфически перенести сингенным животным с помощью толерантных Т-клеток селезенки (инфекционная толерантность). Эти эксперименты подтверждают предположение о существовании популяции Т-клеток, специфически ингибирующих кооперативные взаимодействия Т- и В-лимфоцитов. Мак-Каллаг [150] также показал, что толерантность к БЭ у крыс можно перенести от толерантных животных нативным с помощью лимфоцитов грудного лимфатического протока.

Эти наблюдения согласуются с рядом сообщений о супрессорной функции Т-лимфоцитов. Бэйкер и др. [151] установили, что однократное введение мышам

небольшой дозы антилимфоцитарной сыворотки (АЛС) во время иммунизации SIII полисахаридом пневмококка приводит к значительному усилению анти-SIII-ответа. В дальнейшем эти авторы сообщили, что ответ на SIII регулируется клетками двух типов, которые либо усиливают, либо подавляют антительный ответ [152]. Тада и сотр. [153—155] исследовали роль Т-клеток в гомоцитотропном (IgE) антительном ответе у крыс. При этом они обнаружили, что удаление у взрослых особей тимуса, тотальное облучение в сублетальных дозах и обработка определенными иммуносупрессирующими агентами, включая АЛС, вызывает значительное повышение IgE-антительного ответа, который длится дольше, чем у интактных животных. Было высказано предположение, что усиление антительного ответа и увеличение его продолжительности могут быть обусловлены инаktivацией супрессорных клеток тимусного происхождения в результате проведенных манипуляций. Эта точка зрения нашла подтверждение в последующих исследованиях, в которых введение нормальных сингенных (в случае SIII) или иммунных (в случае IgE-антительного ответа) тимоцитов животным, уже продуцирующим антитела, приводило к супрессии и прекращению ответа [152, 155].

Вскоре активность Т-супрессоров была обнаружена в различных экспериментальных системах, а именно: после индукции толерантности [156—158], после первичной иммунизации [159], у мышей с низкой иммунореактивностью [160], при противоопухолевом иммунитете [161], при антигенной конкуренции [162], при состоянии толерантности в реакции контактной гиперчувствительности [163], а также при аллотипической и идиотипической супрессии. Наблюдаемая супрессия была либо антиген-специфической, либо неспецифической, что указывает на существование различных популяций Т-супрессоров. Таким образом, было установлено, что Ts играют существенную роль в регуляции различных реакций как гуморального, так и клеточного иммунитета, осуществляемой различными механизмами. Они также участвуют в контроле аутоиммунных и аллергических заболеваний и поддержании толерантности к собственным антигенам.

То, что Ts являются регуляторными клетками, отличными от хелперных Т-клеток, стало ясным из работы Кантора и Бойза [164], показавших, что часть Т-клеток, экспрессирующих антигены Lyt-2,3, но не Lyt-1, обладает выраженной супрессорной, но не хелперной активностью. После этого ряд исследователей показали, что Ts относятся к субпопуляции, отличной как от CTh-, так и от IgTh-типов Т-хелперов.

Дальнейшие исследования продемонстрировали, что подавление иммунного ответа Т-клетками является многоступенчатым процессом, в котором участвуют разные субпопуляции Т-клеток. Как и в случае хелперного компартамента регуляторных клеток, также обнаружены когнатные, некогнатные и иммуноглобулин-специфические супрессорные взаимодействия. Кроме того, четко продемонстрировано наличие внутренних механизмов подавления по принципу обратной связи и усиления самого процесса супрессии, образующих в совокупности чрезвычайно сложную регуляторную систему, называемую иммунным каскадом (цепь) [165—167]. Установлено, что некоторые из супрессорных эффектов вызваны растворимыми факторами, антиген-специфическими и неспецифическими, рестриктированными и нерестриктированными. В связи со сложностью системы супрессии в сообщениях ряда исследователей отмечаются определенные противоречия в вопросе о конкретной роли и фенотипе клеток, составляющих супрессорную цепь. В этом разделе мы обсудим некоторые ключевые моменты супрессии, вызванной Т-лимфоцитами, сравнивая различные экспериментальные системы.

18.7.2. Гетерогенность Т-супрессоров

Супрессия антительного ответа индуцируется в результате сложной последовательности клеточных взаимодействий, в которых участвуют различные типы клеток. В исходных сообщениях о Тs авторы описали типы клеток, участвующих в супрессии иммунного ответа [149, 152, 155]. Клетки этих типов включали индукторные, трансдукторные, усиливающие (амплифайерные) и конечные эффекторные Тs, отличающиеся как по функции, так и по фенотипу. Хотя сейчас мы можем более точно анализировать способ и место действия этих различных клеток, составляющих супрессорную цепь, пока установлено лишь общее отличие антиген-специфических и неспецифических Тs. Отмечены физиологические взаимосвязи между антиген-специфическими и неспецифическими механизмами супрессии. Например, антиген-специфические Тs в конце концов активируют неспецифические Тs, использующие макрофаги, в качестве эффекторных клеток [125, 157, 163, 168]. Поскольку мы обсуждаем взаимосвязи и взаимодействия разных субпопуляций Тs, здесь будут описаны некоторые общие свойства антиген-специфических и неспецифических Тs.

Антиген-специфические Тs определяются только по их конечной специфической супрессорной активности независимо от используемого механизма супрессии. В общем случае такие клетки активируются антигеном или антигеном, презентированным на поверхности специализированных макрофагов, и в присутствии так называемых индукторных клеток. Эти клетки несут антиген-связывающие рецепторы и высвобождают антиген-специфические факторы. Такие клетки способны передавать сигнал вторым клеткам-партнерам (как клеткам-мишеням супрессии, так и промежуточным клеткам-передатчикам) посредством кожных взаимодействий или высвобождения антиген-специфических супрессорных факторов, которые могут быть (но не обязательно) рестриктированы по МНС. В определенных экспериментальных условиях специфические Тs с идиотипическими (Id) или антиидиотипическими (анти-Id) рецепторами используют второй тип клеток, экспрессирующих соответствующий анти-Id или Id (Ig-Ts), для активации в отсутствие антигенной стимуляции. В других случаях специфические Тs могут быть стимулированы антигеном, но их конечный эффект опосредуется антиген-неспецифическим фактором. Неспецифические Тs могут активироваться митогенами, такими, как конканавалин А, ЛПС, или аллогенными клетками (негативные аллогенные эффекты), и продуцировать неспецифические факторы.

В связи со сложностью супрессорных механизмов мы введем следующие обозначения Тs, используемые независимо от способа активации: идиотип-, аллотип- или изотип-специфические Тs (IgTs). Кроме того, при обсуждении супрессорного цикла будут использоваться такие обозначения, как индукторные, усиливающие и эффекторные Тs. Хотя некоторые исследователи используют терминологию Ts1, Ts2 и так далее, эти обозначения в разных экспериментальных системах не соответствуют одним и тем же типам клеток. Мы будем использовать эти обозначения только в случае необходимости. Кроме того, существует ряд разных антиген-неспецифических Тs, индуцируемых различными стимулами. В качестве эффекторных молекул эти клетки продуцируют антиген-неспецифические факторы TsF. Мы обсудим взаимодействие специфических и неспецифических Тs в регуляторном цикле.

18.8. Антиген-неспецифические Т-супрессоры и их факторы

Неспецифические Ts принимают участие во множестве иммунных реакций. Наиболее важная среди них — антигенная конкуренция, при которой введение антигена (Т-зависимого антигена) значительно подавляет антительный ответ на иммунизацию вторым антигеном, последовавшую через короткий промежуток времени [162, 169, 170]. Сходные антиген-неспецифические супрессорные эффекты индуцируются *in vivo* при реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [171] и *in vitro* в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) [172], а также при митогенной стимуляции [173—175]. Мы обсудим здесь только типичные антиген-неспецифические Ts, детально изученные при антительном ответе у мышей.

Даттон [176] первым обнаружил, что добавление к клеткам селезенки мышей конканавалина А (Кон А) в концентрациях, слегка превышающих оптимальные, приводит к значительному подавлению первичного и вторичного антительного ответа *in vitro* на БЭ и ТНФ-КЛН. Эти данные были подтверждены и дополнены несколькими исследователями, показавшими, что Кон А подавляет также генерацию цитотоксических Т-клеток и реакцию СКЛ. Поскольку субмитогенные дозы Кон А усиливали иммунный ответ, Даттон [176] пришел к выводу, что митогенная стимуляция Кон А активирует и хелперные, и супрессорные Т-клетки. Генерация супрессорных Т-клеток под действием Кон А была продемонстрирована также *in vivo*, когда клетки селезенки обрабатывали высокими дозами Кон А, подавляющими антительный ответ *in vitro* [177]. Эта супрессия осуществлялась Т-клетками, поскольку в тех случаях, когда активации конканавалином А предшествовала обработка клеток селезенки анти-Thy-1- или анти- θ -сывороткой, супрессорная активность не обнаруживалась. Супрессоры, индуцированные конканавалином А, оказались Т-лимфоцитами $\text{Lyt}2^+$, 3^- , отсутствующими у бестимусных (nude) мышей; их активность снижается также в результате удаления у взрослых мышей тимуса.

Рич и Пирс [177] показали, что супернатант культур клеток селезенки, стимулированных Кон А, подавляет ответ нормальных клеток селезенки на посторонние антигены *in vitro*. В соответствующих концентрациях этот неспецифический супрессорный фактор неспецифически подавляет ряд ответов *in vitro*, включая ответ Т- и В-лимфоцитов на митогены, первичный и вторичный антительные ответы на Т-зависимые и Т-независимые антигены, реакцию СКЛ и образование цитотоксических Т-лимфоцитов [175]. Растворимый супрессор иммунного ответа (SIRS) не обладает линейной специфичностью и не несет детерминант, сцепленных с МНС. Таким образом, супрессия, вызванная SIRS, по-видимому, противостоит неспецифической помощи.

Показано, что растворимый супрессор иммунного ответа действует на макрофаги, а медиаторы, продуцируемые обработанными SIRS макрофагами, вероятно, являются эффекторными молекулами, подавляющими различные виды иммунного ответа [178, 179]. Сравнительно недавно было обнаружено, что SIRS могут продуцироваться клонированными линиями Т-клеточных гибридом. Это, по-видимому, ускорит изучение биохимических свойств фактора и расшифровку эффекторного механизма его действия.

18.9. Антиген-специфические Т-супрессоры

Определение СТs является исключительно операциональным, поскольку оно просто обозначает тип клеток, который в конечном счете вызывает специфическое подавление иммунного ответа. Однако в основе такой специфической супрессии лежит ряд взаимодействий между клетками, различающимися по фенотипу. Таким образом, трудно дать унифицированную концепцию СТs. В связи с этим мы просто рассмотрим некоторые из известных СТs на основе феноменологии, установленной в различных экспериментальных системах. Хотя предлагаемая классификация является крайне упрощенной, читателю будет полезно обратиться к ней при анализе регуляторных цепей разных типов.

18.9.1. Т-супрессоры, индуцируемые при толерантности

Впервые этот феномен убедительно продемонстрировали Гершон и Кондо [149], обнаружившие, что Т-клетки мышей, иммунизированных высокой дозой БЭ, переносили неспособность к ответу интактным животным (инфекционная толерантность). Именно с этого открытия начался по существу новый «золотой век» «Т-клеточной» иммунологии, ознаменовавшийся интенсивными исследованиями регуляторной роли Т-лимфоцитов. Во многих экспериментальных системах, в которых иммунологическая толерантность индуцируется высокой дозой растворимого антигена, выявляются антиген-специфические клетки типа СТs [180—183], хотя одним только их присутствием нельзя объяснить поддержание толерантности. Сообщалось также о присутствии Ts и при низкодозовой толерантности [184]. Дальнейшие исследования многоэтапной индукции и гомеостатической регуляции антиген-специфических Ts, проведенные Гершоном и его коллегами, обсуждаются в следующих разделах.

18.9.2. Супрессорные Т-клетки, специфичные к Т-независимым антигенам

Было обнаружено, что ответ мышей на некоторые тимус-независимые антигены находится под контролем Ts [185]. Удаление Т-клеток с помощью АЛС повышает уровень ответа на полисахарид пневмококка SIII и, кроме того, отменяет низкодозовую толерантность на SIII.

18.9.3. Примированные антигеном Т-супрессоры

Кроме использования толерирующей дозы антигена, антиген-специфические Ts можно также индуцировать иммунизирующими дозами антигена [159]. У крыс гипериммунизация антигеном в полном адъюванте Фрейнда [155] индуцирует антиген-специфические Ts, способные (избирательно) подавлять IgE-антительный ответ. Относительно высокие, но еще иммуногенные дозы антигенного носителя также способны индуцировать у мышей СТs, подавляющие первичный и вторичный антительный ответ на гаптен при переносе второму реципиенту, иммунизированному гаптеном на гомологичном носителе. Даже при иммунизации мышей оптимальной дозой антигена обработанные анти-Lyt-1-антителами клетки селезенки, лишенные хелперных Т-клеток, часто вызывают сильную супрессию. Таким образом, первичная иммунизация антигеном вызывает одновременную генерацию СТs и СТ_h.

18.9.4. Т-супрессоры у генетически неответающих животных

У мышей, не образующих антитела на некоторые антигены, обнаружены антиген-специфические Ts, контролируемые *Ir*-генами локуса *H-2* [160, 186]. Специфическое отсутствие ответа на данный антиген у этих неответающих линий приписывается развитию специфических Ts. Наиболее убедительно это было показано на животных, не способных отвечать на полипептид L-глутаминовую кислоту⁶⁰, L-аланин³⁰, L-тирозин¹⁰ (GAT). Мыши гаплотипов *H-2^{a, b, d, k}* относятся к линиям, отвечающим на GAT, а мыши гаплотипов *H-2^{p, q, s}* — к неответающим линиям. Однако при иммунизации комплексами GAT и метилированного БСА (GAT-мБСА) мыши неответающих линий дают выраженный антительный ответ на GAT. Предварительное введение неответающим животным GAT специфически подавляет их способность развивать GAT-специфический ответ при стимуляции GAT-мБСА. Такое состояние супрессии можно перенести интактным сингенным мышам с помощью клеток селезенки супрессированных животных. Сходные данные были получены при работе с GT, другим линейным сополимером, ответ на который также контролируется геном *Ir*, ассоциированным с локусом *H-2*. Ниже мы рассмотрим клеточные и молекулярные основы этого типа супрессии.

18.9.5. Т-супрессоры при клеточном иммунитете

В многочисленных сообщениях описываются Ts, ограничивающие клеточный иммунный ответ, а именно: гиперчувствительность замедленного типа, контактную гиперчувствительность, индуцированный антигеном Т-клеточный пролиферативный ответ, ответ цитотоксических Т-лимфоцитов и противоопухолевый иммунитет. Не известно, участвуют ли одни и те же Ts в регуляции клеточного иммунитета и гуморального ответа. Некоторые интересные характеристики Ts, установленные в этой группе экспериментов, будут рассмотрены ниже.

18.10. Ig-специфические супрессорные Т-клетки (IgTs)

Аналогично хелперным Т-клеткам некоторые Ts регулируют антительный ответ в зависимости от конкретной структуры иммуноглобулинов. Эти Ts включают идиотип-, аллотип- и изотип-специфические Ts. Мы обсудим некоторые свойства этих IgTs, а именно IdTs, анти-IdTs и аллотипических Ts.

18.10.1. Идиотип-специфические супрессорные Т-клетки (IdTs)

Супрессорные Т-клетки, специфичные к идиотипу, были обнаружены в различных экспериментальных системах. Как говорилось ранее, мыши A/J в ответ на иммунизацию углеводным компонентом стрептококка группы А (А-СНО) продуцируют большое количество идиотип-(А5А)-положительных антител. Эйхманн [187] получил у морских свинок антиидиотипические (анти-А5А) антитела и разделил эти антитела на фракции IgG₁ и IgG₂. Он вводил анти-А5А IgG₂-антитела мышам A/J, которых спустя 2 месяца стимулировали А-СНО. Такие животные были способны продуцировать анти-А-СНО-антитела, но только не экспрессирующие А5А-идиотип. Было показано, что эта супрессия А5А-идиоти-па вызвана супрессорными Т-клетками, индуцированными анти-А5А-антителами. Предполагается, что в этой системе IdTs несут А5А-идиотип и, вероятно,

подавляют анти-Id-хелперные Т-клетки (IgTh), предотвращая тем самым экспрессию Id⁺-В-клеточного ответа [55, 56].

Аналогичную ярко выраженную супрессию образования идиотипа, вызванную Ts, наблюдали также Оуэн и др. [188]. В этой работе мышей А/Ж иммунизировали конъюгатом арсонат-KLN после введения антиидиотипических антител. У таких животных благодаря наличию Id⁺-Ts оказалось глубоко подавленным образование перекрестно-реагирующего Арс-идиотипа, что обусловлено Id⁺-Ts. Удаление этих клеток с помощью розеткообразования с эритроцитами, покрытыми антителами против Id, приводило к отмене супрессорной активности. Эти IdTs были неэффективными при адоптивном вторичном антиарсонатном антительном ответе.

В отличие от этого идиотип, конъюгированный с сингенными (или аллогенными) лимфоцитами, способен индуцировать антиидиотипические Ts (анти-IdTs). Дохи и Нисонофф [189] показали, что предварительная иммунизация мышей А/Ж сингенными Арс-идиотип-конъюгированными тимоцитами значительно подавляет образование Арс-идиотипа и что это объясняется индукцией анти-Арс-идиотипических Ts. Мы не будем вдаваться в обсуждение роли хорошо известных анти-IdTs в ГЗТ, где взаимодействие между IdTs и анти-IdTs детально исследовано [190, 191] (см. гл. 26).

IdTs и анти-IdTs были обнаружены не только в арсонатной, но и в других антигенных системах. К ним относится генерация IdTs при введении NP, конъюгированного с сингенными лимфоцитами или неиммуногенными носителями [192, 193]. Такие супрессоры способны подавлять ГЗТ и образование антител против NP. Супрессорные Т-клетки, специфичные к обычным антигенам, таким, как лизоцим куриных яиц (ЛКЯ), несут перекрестно-реагирующий идиотип, экспрессированный на антителах против ЛКЯ [54].

Каково значение IdTs и анти-IdTs, пока еще точно не установлено. Вероятно, эти регуляторные клетки играют важную роль в механизмах регуляции сетевого типа. Как это будет ясно из последующего обсуждения, IdTs индуцируют анти-IdTs, активирующие третий тип клеток Id⁺ [194]. Этот вид избирательной линейной активации различных функциональных типов клеток отличается от первоначальной схемы сетевых взаимодействий и может иметь важное значение как механизм усиления слабого сигнала, вызывающий значительные изменения спектра продуцируемых антител. Место этой линейной активации в сетевой регуляции иммунной системы следует еще тщательно исследовать; необходимо также выяснить связь линейной активации с аллотип- и эпитоп-специфической регуляцией.

18.10.2. Аллотип-специфические супрессорные Т-клетки

Как уже говорилось, пренатальное введение плоду определенных антиаллотипических антител вызывает хроническую супрессию образования данного аллотипа [42, 43]. Это связано с индукцией аллотип-специфических Ts [195]. У животных F₁ (Igh^a/Igh^b), которым пренатально вводили антитела к Igh^a-аллотипу IgG2a, подавлено образование аллотипического варианта «а» IgG2a, но не «b» (рис. 18.9, а). Кинетика супрессии характеризуется тем, что у некоторых животных в возрасте 20 недель наблюдается временное ослабление супрессии, которое затем переходит в хроническую супрессию. Супрессия связана с присутствием Ts, как это было установлено при изучении вторичного адоптивного антительного ответа (рис. 18.9, б). Мишенями аллотипических Ts служат IgTh, контролирующие образование одного из аллотипов. Таким образом, эта модель дает ключ к пониманию аллотип- и идиотип-специфической регу-

ляции, опосредованной Ts и Th. IgTs, включенные в эту систему регуляции, оказались Lyt-1^{-2+} и I-J^{+} . Супрессорный эффект опосредуется растворимым фактором.

Аллотипическая супрессия сама по себе представляет Igh-рестриктированный регуляторный механизм; включающий IgTh и IgTs, и в конечном счете

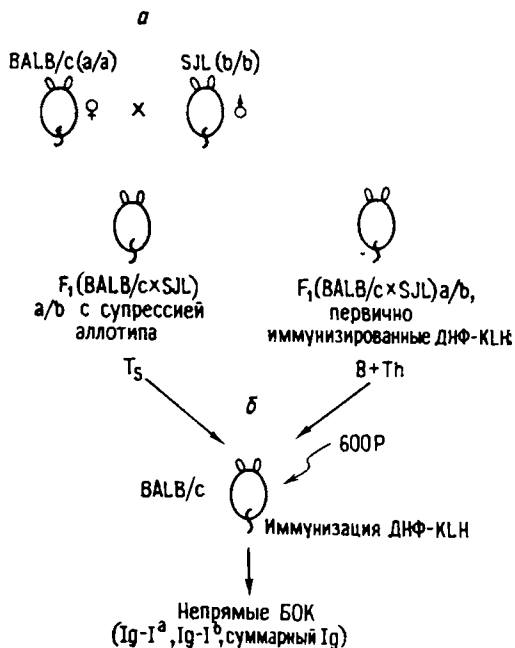


Рис. 18.9. Схема опыта по изучению аллотипической супрессии у животных F_1 (а) и при адоптивном переносе облученному реципиенту (б) [По [42, 43].]

контролирует экспрессию клеток памяти [196]. Некоторые интересные особенности супрессии, такие, как ослабление супрессии, наблюдаемое в возрасте 20 недель, могут интерпретироваться как проявление «контрасупрессии», выходящей IgTh из-под влияния IgTs. Кроме того, исследуется связь супрессии аллотипа и эпитоп-специфической супрессии, представляющей собой антиген-специфическую и тем не менее Igh-рестриктированную регуляцию [245].

18.11. Антиген-специфические супрессорные Т-клеточные факторы

В свете многообразия антиген-специфических Ts, вовлеченных в регуляцию антительного ответа, в этом разделе мы рассмотрим гетерогенность медиаторов, передающих супрессорный сигнал от клеток одного типа клеткам другого типа. Ряд исследователей обнаружили факторы, подавляющие иммунный ответ в результате воздействия на различные этапы супрессорного пути. Тада и др. [197] описали антиген-специфический фактор (TsF), экстрагированный из тимоцитов и клеток селезенки крыс, многократно иммунизированных белком-носителем. Введение этого клеточного экстракта сингенным реципиентам отменяло запущенный IgE антительный ответ на гаптен, конъюгированный с исходным носителем. Детальная характеристика фактора показала, что TsF а) связывает антиген, б) не имеет обычных Ig-детерминант, в) со строгой зависимостью от

антигена угнетает антительный ответ, г) представляет собой белок с мол. массой не более 70 кДа. Используя наиболее охарактеризованную систему ответа мышей на конъюгат гаптен-носитель, та же группа исследователей установила несколько важных свойств TsF. Оказалось, что TsF гипериммунных мышей а) несет детерминанты, кодируемые в субобласти *I-J* комплекса *H-2* [198], б) индуцирует дифференцировку эффекторных Т-супрессоров, действуя на примированные антигеном Т-клетки *Lyt-1⁺2⁺*, в) характеризуется строгой генетической рестрикцией Т-клеток по субобласти *I-J* [200].

Подобные супрессорные экстракты, специфичные к антигенам, находящимся под *Ir*-генным контролем, были выделены из клеток селезенки мышей неответающих линий, которым вводили GAT и GT [201—206]. Эти исследователи связали генетическую регуляцию иммунного ответа в этих системах с образованием TsF, контролируемым областью *I*. Как обсуждалось в предыдущем разделе, животные, не отвечающие на GT и GAT, способны образовывать Ts, подавляющие первичный антительный ответ на GAT, конъюгированный с метилированным бычьим сывороточным альбумином (GAT-мБСА). С помощью физической экстракции из таких супрессоров был получен супрессорный фактор. Эти исследователи обнаружили, что GAT — TsF обладает средством к GAT и может быть элюирован с GAT-иммуносорбента с помощью элюции, подобной используемой при очистке антител против GAT. Хотя данный фактор и обладает детерминантами, кодируемыми в субобласти *I-J* [205], его действие не рестриковано по *H-2* [204]. Этот GAT-специфический TsF является индуктором Ts второго порядка (Ts₂), а не непосредственным эффектором супрессии [207]. Действительно, GAT-TsF, полученный от мышей неответающих линий, способен генерировать Ts₂ в популяции селезеночных клеток мышей ответающих линий.

Было показано, что в отличие от таких экстрагированных факторов индуцированные *in vitro* Ts (Т-клетки, культивируемые в присутствии высокой дозы антигена в течение 4 дней) высвобождают антиген-специфический TsF при повторной стимуляции тем же антигеном [132]. Авторы этой работы получили супернатанты культур, содержавшие TsF, специфичные к «обычным» антигенам (KLH, KГГ), гаптenu (NP) и синтетическим сополимерам аминокислот (GAT, (T, G)-A — L) [208]. Хотя TsF, индуцированный *in vitro*, обладал такой же исключительной специфичностью к антигену и детерминантами, контролируемые областью *I*, между экстрагированным и секретированным факторами существует ряд различий. Секретированный CTsF нерестриктирован по *I-J* и может продуцироваться клетками селезенки как ответающих, так и неответающих линий; непосредственной мишенью CTsF являются обычные хелперные Т-клетки (CThI) [208—210].

Ямаучи и др. [211, 212] также получили секретированные супрессорные факторы, действующие на другие клетки-мишени. Один из них представляет собой антиген-специфический фактор, секретлируемый *in vitro* *I-J⁺*, *Lyt1⁺*-Т-клетками мышей, примированных к БЭ, в отсутствие антигена [*Lyt1* TsiF (фактор, индуцирующий Т-супрессоры)]. Супернатант этих культур содержит медиатор, действующий на Т-клетки *Lyt1⁺2⁺* *I-J⁻*, и индуцирует окончательный супрессорный эффект. *Lyt-1* TsiF состоит из двух цепей: одна несет антиген-связывающий участок, но не детерминанты *I-J*, а другая — *I-J*-контролируемые детерминанты [213]. Ямаучи и др. [213] обнаружили, что *Lyt-1* TsiF действует на Т-клетки *Lyt-2⁺*, заставляя их индуцировать второй фактор [*Lyt-2* TseF (фактор Т-супрессоров-эффекторов)], подавляющий хелперную функцию Т-клеток *Lyt-1⁺*. Таким образом, установлено, что супрессия является многоэтапным процессом, в котором Tsi-клетки *Lyt-1⁺*, *I-J⁺* (индукторы) высвобождают TsiF, активирующий Tse-клетки *Lyt-2⁺*, *I-J⁺* (эффекторы), активность которых

опосредуется TseF, супрессирующим хелперные Т-лимфоциты Lyt-1^+ (рис. 18.10). Этот фактор также обладает антигенной специфичностью, но не экспрессирует детерминант I-J. Было сделано два наблюдения: Lyt-1 TsiF действует на акцепторные Т-клетки Lyt-2^+ только в случае совпадения их IgV_H -локусов, несмотря на то, что а) TsiF несет детерминанты I-J на одной из полипептидных цепей и б) Lyt-2 TseF может супрессировать только Lyt-1^+ Т-хелперные клетки линий, совместимых по $H-2$, хотя этот последний фактор и не несет детерминант I-J. Из всего этого можно сделать вывод о том, что взаимодействие двух этих факторов необходимо для проявления конечного супрессорного эффекта [214].

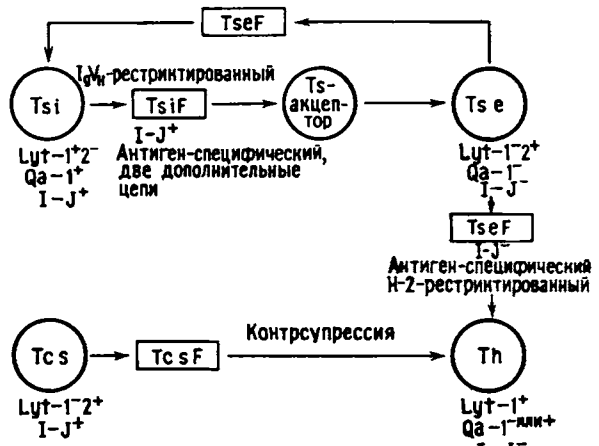


Рис. 18.10. Регуляторная цепь, построенная при анализе первичного антительного ответа на БЭ. Детали см. в тексте. (По [211, 212].)

I-J-положительная полипептидная цепь Lyt-1 TsiF, не связывающая антиген, соединяется с антиген-связывающей цепью Lyt-2 TseF в результате взаимодействия между I-J и «анти-I-J»-подобной структурой. Эта комплексная молекула приобретает теперь две активности: антиген-связывающий участок, полученный от Lyt-2 TseF, и IgV_H -рестрикцию по отношению к клетке-мишени, которая свойственна I-J⁺-полипептидной цепи Lyt-1 TsiF. Комплексная молекула может оказывать супрессорное действие на соответствующие клетки-мишени, реагируя на антиген и собственные антигенные детерминанты (структура, сцепленная с IgV_H). Эта модель, по-видимому, объясняет сложные взаимодействия клеток и факторов различных типов, выполняющих супрессорную функцию. Однако для окончательного подтверждения этой гипотезы необходимо провести соответствующие биохимические исследования.

В связи с этим требованием создается все большее число функциональных Т-гибридом и клонированных Т-клеточных линий, секретирующих антиген-специфические супрессорные факторы, что позволяет точнее анализировать различные TsF [215, 216]. Хотя мы не можем рассмотреть все TsF гибридного происхождения, некоторые наиболее важные их свойства будут обсуждены в этом разделе. Танигучи и соавт. [217] получили ряд КЛН-специфических Т-клеточных гибридом, из которых им удалось экстрагировать TsF, КЛН-связывающий I-J. Это привело к нескольким важным наблюдениям. Во-первых, TsF состоит из двух полипептидных цепей: одна несет детерминанты I-J, а другая — антиген-связывающий участок. Во-вторых, антиген-связывающий полипептид экспрессирует детерминанты, сцепленные с генетическим локусом IgV_H [218]. В-третьих, эти два полипептида независимо транслируются *in vitro* в ооцитах лягушки двумя независимыми мРНК, экстрагированными из Т-клеточной гибридомы [219]. В-четвертых, антиген-связывающий полипептид опре-

делает специфичность супрессии, а I-J⁺-полипептид участвует в генетической рестрикции, причем для супрессорной функции необходима ассоциация этих двух цепей.

Существует ряд других гибридов, продуцирующих TsF, специфичные к БЭ [220], гаптену [221, 222], синтетическим кополимерам аминокислот [223] с несколько различающимися свойствами. БЭ-специфический TsF гибридного происхождения имеет мол. массу около 200 кДа и несет детерминанты, контролируемые областью, расположенной правее области I-J, но не областью I-J. Этот фактор действует непосредственно на В-лимфоциты. Гаптен (NP)-специфический TsF несет I-J-ассоциированный основной перекрестный идиотип (NP^b) в сочетании с детерминантами I-J. Интересен и GAT-специфический TsF, который, по-видимому, представляет собой один полипептид с мол. массой 24 кДа [224]. Все антиген-связывающие участки, идиотипы и детерминанты I-J выявляются на этой единственной полипептидной цепи. Трансляция *in vitro* мРНК из этой гибридомы подтвердила характеристику данного TsF [225]. Авторы работы считают, что этот TsF играет роль эффектора в GAT-специфическом супрессорном цикле.

Антиген-специфические супрессорные факторы, несколько отличающиеся от TsF гибридного происхождения, могут быть получены в супернатантах клонированных Т-клеточных линий, культивируемых в присутствии фактора роста Т-клеток [226—228]. Т-клеточная линия, полученная Фресно и др. [226, 227], способна подавлять ответ хелперных Lyt-1⁺ Т-клеток на БЭ. Фактор этой Т-клеточной линии представляет собой полипептид с мол. массой 67 кДа, обладающий антиген-связывающей активностью. Этот фактор, вероятно, является TsF, поскольку он подавляет хелперные Lyt-1⁺-Т-клетки. Фактор специфичен к гликофоруину, основному антигенному гликопротеину БЭ. Действие этого TsF генетически не рестриktировано. Другая, специфичная к ЛДГ_В Т-клеточная гибридома также продуцирует TsF, который подавляет ЛДГ_В-специфические хелперные Т-клетки и ответ на ЛДГ_В клонированной хелперной Т-клеточной линии [229]. Этот фактор характеризуется строгой рестрикцией, определяемой геном субобласти I-A; он экспрессирует детерминанты, которые выявляются моноклональными антителами, специфичными к продуктам субобласти I-A, отличающимся от обычных Ia-антигенов В-лимфоцитов. Фактор вызывает глубокую супрессию ответа на ЛДГ_В, подавляя специфическую хелперную Т-клеточную активность, вероятно, вследствие угнетения пролиферации Т-клеток на ассоциированный с макрофагами антиген. Другой TsF, продуцируемый специфичной к KLN клонированной супрессорной Т-клеточной линией, представляет собой фактор, который вызывает супрессию в результате когнатных взаимодействий между TsF и KLN-специфическими Lyt-1⁺ хелперными Т-лимфоцитами [230]. Этот фактор не вызывает неспецифической (поликлональной) супрессии (эффект «свидетеля») и несет детерминанты I-J, отличающиеся от детерминант, выявляемых на TsiF гибридного происхождения.

Эти наблюдения свидетельствуют о существовании множества TsF, участвующих на разных этапах в одном регуляторном каскаде. Убедительно доказано существование четкого различия между индукторными и эффекторными TsF. Однако еще предстоит выяснить значение H-2- и Ig-ассоциированных детерминант, выявленных на различных TsF, а также биохимически идентифицировать функционально определяемые TsF с различными свойствами. В настоящее время во многих лабораториях проводится биохимическое и молекулярно-генетическое изучение этих факторов. В течение нескольких лет мы, вероятно, сможем, основываясь на биохимических данных, разобраться в противоречивых на настоящий момент результатах.

18.12. Регуляторные цепи

Ряд исследователей считают, что супрессия обусловлена не только действием данной конкретной субпопуляции иммунокомпетентных клеток, но достигается в результате последовательного процесса, в ходе которого различные типы клеток определяют развитие и интенсивность иммунного ответа. Так, было показано, что первоначальный антигенный сигнал активирует последовательный процесс, при котором для осуществления конечного, заранее заданного эффекта сигналы передаются через различные типы лимфоидных клеток. В этом процессе представлены звенья как положительной, так и отрицательной регуляции по типу обратной связи, которые модифицируют конечный ответ. Именно такая система, часто называемая «иммунологической цепью», обсуждается в данном разделе.

Наиболее важное различие между концепцией иммунологической сети (network) и цепи (circuit) заключается в том, что сеть имеет дело с регуляцией, опосредованной переменными доменами Ig, и независимо от типа клеток, экспрессирующих эти домены, тогда как цепь представляет собой взаимодействия клеток различного типа независимо от используемых ими способов коммуникации. Каждый клеточный компонент этой коммуникационной цепи экспрессирует характерные поверхностные маркеры, ассоциированные с генетически заданной функцией. Напомним еще раз, что наблюдаются клеточные взаимодействия трех типов: когатные, поликлональные и Ig-рестриктированные взаимодействия. Важную роль в рестриктированных взаимодействиях клеток играют главный комплекс гистосовместимости и гены *Ig*.

18.12.1. Цепь, включающая в себя супрессию по принципу обратной связи

Взаимодействия Т-клеток различных типов: а) индукторной клетки (Tsi), б) трансдукторной, регуляторной или акцепторной клетки, в) эффекторной клетки (Tse) — стали предметом анализа. При изучении супрессии первичного антительного ответа на БЭ Идли и др. [231] обнаружили, что антиген сначала активирует Т-клетки с поверхностным фенотипом Lyt-1^+2^- , Qa-1^+ , I-J^+ . Клетка этого типа называется «индуктором супрессоров» (Tsi). Она аналогична Т-хелперам в отношении экспрессии Lyt-1 и способности индуцировать второй тип клеток. Однако вместо кооперации с В-лимфоцитами Тsi-клетки запрограммированы на активацию трансдукторных или регуляторных клеток, экспрессирующих фенотип Lyt-1^+2^+ , I-J^+ , Qa-1^+ [232]. Трансдукторные клетки определяются соответственно как клетки, принимающие сигнал от Tsi. Это взаимодействие индукторов и трансдукторов опосредовано антиген-специфическим фактором, названным Lyt-1 TsiF , который несет детерминанты, контролируемые геном субобласти *I-J* [211]. Хотя Lyt-1 TsiF экспрессирует детерминанты *I-J*, он действует только на $\text{Lyt-1}^+2^+3^+$ -клетки мышей, идентичных по локусу IgV_H с донором Lyt-1 TsiF . Генетическая рестрикция по МНС при этом не обнаружена.

Получив сигнал от индукторов Lyt-1^+ , трансдукторные клетки Lyt-1^+2^+ дифференцируются в Lyt-2^+ -эффекторные супрессорные клетки (Tse) или активируют предсуществующие Tse, которые могут подавлять как функцию Т-хелперов Lyt-1^+ , так и сами клетки-индукторы супрессорных клеток (обратная супрессия). На этом конечном эффекторном этапе действует антиген-специфический фактор второго типа (Lyt-2 TseF), продуцируемый клетками Lyt-2^+ ,

I-J⁻, Qa-1⁻. Способность Lyl-2 TseF индуцировать супрессию не зависит от присутствия Lyl-1⁺2⁺-трансдукторных клеток [212]. Интересно, что, хотя Lyl-2 TseF и не экспрессирует I-J-детерминанты, его действие на Lyl-1⁺-хелперные Т клетки-мишени рестриктировано по генам МНС.

Каков механизм взаимодействий этих различных типов клеток? Поскольку взаимодействие, опосредованное I-J TsiF, не рестриктировано по МНС и поскольку Lyl-2 TseF не экспрессирует I-J-детерминант, но рестриктировано по МНС, мы не можем приложить обычную модель когнатных взаимодействий к этим коммуникационным процессам. Таким образом, в дополнение к модели «антигенного мостика» существует, по-видимому, пока еще не объяснимая рестрикция взаимодействия между индуктором и трансдуктором, определяемая неизвестными генами, сцепленными с V_H [213]. Мы уже обсуждали интересную гипотетическую модель, в которой Lyl-1 TsiF и Lyl-2 TseF действуют сочетанно, индуцируя в конечном счете супрессию ответа.

18.12.2. Петля усиления в супрессорной цепи

Тада и др. [233, 234] описали СТs, которые, как оказалось, индуцируют второй набор эффекторных супрессорных клеток, активируя примированные антигеном Lyl-1⁺2⁺, I-J⁺-Т-клетки, иммунные к антигену [233, 234]. Фактор Т-супрессоров, полученный экстракцией из активированных КЛН Т-лимфоцитов, действует на Lyl-1⁺2⁺, I-J-«акцепторные» Т-клетки животных, иммунизированных тем же антигеном. Если такие «акцепторные» клетки удалять из

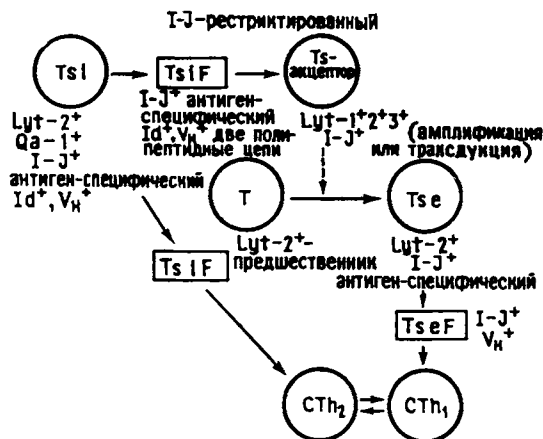


Рис. 18.11. Регуляторная цепь при анализе вторичного антительного ответа на конъюгат гаптен-носитель (По [233].)

популяции отвечающих клеток с помощью обработки антителами против Lyl-1 или Lyl-2, то TsF не способен активировать последующие звенья супрессорного механизма. Для взаимодействия между TsF и акцепторной Т-клеткой необходима идентичность по субобласти I-J. После связывания TsF популяция акцепторных клеток индуцирует появление Ts второго порядка, называемых «индуцированные супрессорные Т-клетки», которые в течение 48 ч ведут себя как эффекторы (Tse) супрессии [234]. Такие индуцированные Tse, экспрессирующие фенотип Lyl-2⁺3⁺, I-J, могут теперь без ограничений по МНС подавлять ответ, развиваемый В-лимфоцитами и Lyl-1⁺ CTH1. На этом конечном этапе супрессии наблюдаются и антиген-специфические, и неспецифические супрессорные эффекты, что указывает на участие как специфических, так и неспецифических факторов (рис. 18.11).

Интересным моментом в данной модели является роль акцепторных Т-клеток в этой супрессорной цепи. Акцепторная Т-клетка Lyt-1^+2^+ сама по себе не дифференцируется в Tse, но ее присутствие необходимо для индукции Tse из предшественников. Предшественниками являются Т-клетки Lyt-2^+ , I-J^+ , они дифференцируются в Tse только в окружении, в котором присутствуют одновременно и акцепторные Т-клетки, и TsF (трандукция).

Сообщалось и о другом механизме, когда I-J^+ CTsF непосредственно подавляет активность CTh2 [235]. Ответ смеси В-лимфоцитов и Th1 не подавляется TsF, пока не активирован процесс трандукции, для которого необходимы клетки Lyt-1^+2^+ . В отличие от этого антительный ответ, вызванный В-лимфоцитами и I-J^+ CTh2, может быть непосредственно супрессирован TsF. Предполагается, что совместимость по субобласти I-J между TsF и Th2 существенна для этого взаимодействия. Таким образом, иммунная система, вероятно, использует два различных механизма: один заключается в прямой супрессии, а другой — в усилении и поддержании супрессорного эффекта путем активации иммунологического каскада (рис. 18.11).

18.12.3. Линейная супрессорная цепь, опосредованная идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями

Несмотря на некоторые отличия от сетевой регуляции, идиотипические структуры регуляторных Т-клеток и факторов оказались ведущими элементами в многоэтапном супрессорном пути. Как говорилось ранее, у неответающих линий мышей, иммунизированных GAT и GT, индуцируется образование Ts [138]. Супрессия опосредуется TsF, которые можно экстрагировать из исходных, активированных антигеном Ts, называемых Ts1. От неответающих животных были получены GAT- и GT-специфические супрессорные факторы в виде экстрактов из Ts1 [138, 236, 237]. Эти факторы являются антиген-специфическими и несут как I-J, так и идиотипические детерминанты. В процессе GAT- и GT-специфической супрессии в действительности участвуют два разных фактора и включается сложная последовательность клеточных взаимодействий. Предполагается, что антиген, соответствующим образом презентированный предшественникам Ts, индуцирует созревание первой популяции Ts, обозначаемой Ts1. Ts1-клетки характеризуются поверхностным фенотипом Lyt-1^+2^- , I-J^+ , а также чувствительностью к циклофосфамиду и, вероятно, соответствуют Ts1 в других системах. Ts1 продуцируют фактор (TsF1), который несет I-J, идиотип и антиген-связывающий участок и стимулирует переход пре-Ts2-клеток Lyt-1^+2^+ в клетки Ts2 (рис. 18.12). Клетки Ts2 несут мембранные маркеры Lyt-1^+2^+ , I-J^+ и являются антиидиотипическими. Ts2 продуцируют фактор TsF2, который действует на Т-хелперы, подавляя ответ на GAT и GT. Таким образом, Ts2 можно рассматривать как эквивалент Tse в других моделях. Действие TsF1 на пре-Ts2-клетки генетически не рестриктировано, тогда как TsF2 может подавлять ответ только у мышей с тем же самым гаплотипом MHC и локусом IgV_H (рис. 18.12).

Другим хорошо охарактеризованным с точки зрения рецепции процессом является регуляция экспрессии идиотипа идиотип-положительными Т-супрессорами. Нисонофф и сотр. [52, 238] показали, что значительная часть антител, продуцируемых мышами A/J в ответ на конъюгат арсонат-носитель, несет перекрестно-реагирующий идиотип (Id). Введение антител к Id подавляет образование Id-положительных антител, причем этот эффект связан в основном с индукцией Ts [188]. Кроме того, Дохи и Нисонофф [189] продемонстрировали, что введение животным Id^+ -антител, конъюгированных с сингенными (или

аллогенными) тимокитами, вызывает избирательную супрессию образования идиотипа. Аналогично этому Си и др. [190, 191] показали, что введение идиотип-модифицированных клеток селезенки также подавляет ГЗТ на арсонат. Эти исследователи установили, что супрессия образования антиарсонатных антител, и арсонат-специфический ГЗТ вызвана фактором, очень схожим по своим свойствам с TsF1 в GAT-системе [236, 237]. Этот фактор индуцирует антиидиотипические Т-клетки (Ts2), которые вызывают супрессию, обусловленную образованием TsF2.

Дальнейшее изучение такого IgV_H-опосредованного регуляторного механизма проводилось при анализе антителного ответа и ГЗТ на гаптен 4-гидрокси-3-нитрофенилацетил (НФ, NP). Мыши, несущие локус *Igh^b*, при первичном

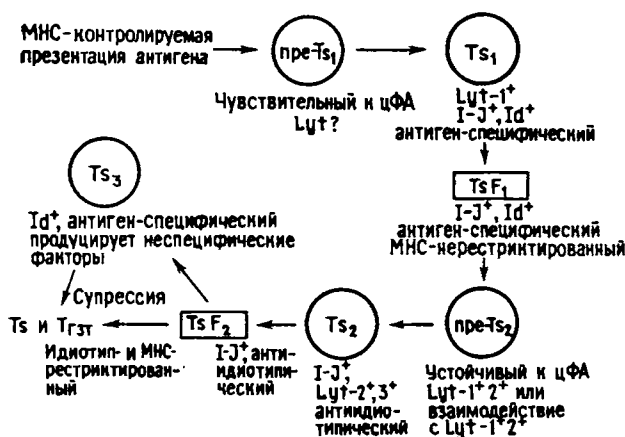


Рис. 18.12. Механизм линейной активации супрессоров, опосредованный идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями. (По [237].) — цФА — циклофосфамид.

иммунном ответе на NP образуют антитела, характеризующиеся связанным с *Igh^b* идиотипом (NP^b) и обладающие большей аффинностью к перекрестно-реагирующему гаптenu 4-гидрокси-3-нитро-5-иодифенилацетилю (NIP, ИНА), чем к NP [239]. Это последнее свойство называется «гетероклитической тонкой специфичностью». Было показано, что NP-специфические Ts с фенотипом Lyt-2⁺, I-J⁺ экспрессируют основной перекрестно-реагирующий идиотип NP^b и избирательно подавляют образование антител против NP, экспрессирующих идиотип NP^b, у мышей *Igh^b*-несущих линий [240]. Уайнбергер и др. [241], а также Окуда и др. [242] продемонстрировали, что в супрессии ГЗТ на NP-О-сукцинимид участвуют по меньшей мере три различные популяции Т-клеток. Этот супрессорный цикл также последовательно активируется в результате идиотип-антиидиотипических взаимодействий. Первая популяция Ts (Ts1) индуцируется антигеном, презентированным сингенными клетками селезенки. Клетки Ts1 в свою очередь активируют антиидиотипические клетки Lyt-2⁺, I-J⁺-Ts2. Клетки Ts2 продуцируют фактор (TsF2), который в конце концов активирует примированную антигеном популяцию Т-клеток, обозначаемую Ts3. Ts3 представляет собой конечную эффекторную супрессорную клетку, которая нейтрализует Т-лимфоциты, участвующие в NP-специфической ГЗТ и в цитотоксическом Т-ответе. Эти исследователи [241, 242] обнаружили, что конечное действие Ts3 также вызвано фактором (TsF3), несущим идиотипические детерминанты I-J и NP^b. Авторам удалось получить гибридомы всех трех типов: Ts1, Ts2 и Ts3 [243]. На рис. 18.12 суммировано большинство экспериментальных данных, полученных при изучении линейных идиотип-антиидиотипических взаимодействий, вызывающих супрессию иммунного ответа на различные антигены.

Возникает вопрос, почему для эффективной супрессии необходим такой сложный линейно-организованный механизм. Поскольку количество исходных антиген-специфических Ts-клеток (Ts1 или Ts2) может быть очень небольшим, такая последовательная активация позволяет амплифицировать регуляторный процесс: на каждый этап супрессорного процесса могут влиять параллельные регуляторные процессы в хелперной или усиливающей цепи. Это открывает возможность определенных эффективных взаимодействий между функциональными клеточными цепями, характерными для иммунной системы.

18.12.4. Эпитоп-специфическая супрессия

Герценберг и др. [244] наблюдали парадоксальное действие первичной иммунизации носителем на последующий антителыный ответ на гаптен, конъюгированный с тем же носителем. Последовательная иммунизация сначала носителем, а затем гаптенем, конъюгированным с тем же носителем (иммунизация носителем/гаптен-носителем), вызывает глубокую супрессию IgG-антительного ответа на гаптен. Основные данные сведены в табл. 18.2.

Таблица 18.2. Обобщенные данные по эпитоп-(ДНФ)-специфической супрессии, индуцированной последовательным введением белков-носителей и конъюгатов гаптен-носитель

Последовательность иммунизаций			Антителыный ответ на		
			ДНФ	KLH	KGT
—	ДНФ-KLH	—	+	+	—
—	ДНФ-KLH	ДНФ-KGT	++	+	+
KLH	ДНФ-KLH	—	—	+++	—
KLH	ДНФ-KLH	ДНФ-KGT	—	++	+

Хотя они рассматривались вначале как проявление обычной супрессии, специфичной к носителю, в дальнейших опытах, когда проводилась третья иммунизация гаптенем на другом носителе (ДНФ-KGT), также была получена значительная супрессия ответа на гаптен. В результате эти исследователи постулировали, что супрессия, специфичная к носителю, превращается в гаптен-специфическую супрессию посредством Igh-ассоциированного регуляторного механизма [245]. Наиболее легко супрессировались IgG_{2a}-, IgG_{2b}- и IgG₃-антителыные ответы, тогда как IgG₁-ответ оказался более устойчивым. Предварительная иммунизация не подавляла антителыного эффекта на носитель, и при повторной иммунизации наблюдался нормальный вторичный (третичный) ответ. Это значит, что супрессия не связана с отменой Ts-помощи, специфичной к носителю, поскольку ответ на носитель не снижался. Было высказано предположение, что специфичные к носителю Ts индуцируют гаптен-специфические Ts. Хотя клетки, входящие в эту систему индукции (трандукции), не охарактеризованы достаточно, эти исследования указывают на существование другого, отличного от специфических к носителю и идиотипу супрессорных цепей механизма, индуцирующего эпитоп-специфические Ts.

18.12.5. Супрессорный эпитоп

В соответствии с концепцией эпитоп-специфической супрессорной цепи существует ряд примеров, когда иммунизация определенными фрагментами белковых антигенов предпочтительно активирует супрессорную цепь и предо-

твращает иммунный ответ на последующее введение цельного белкового антигена [53, 246, 247]. Наиболее исследованной такой системой является изученный Серкарчем и др. [53] ответ на лизоцим куриных яиц (ЛКЯ). Эти исследователи получили два разных фрагмента расщепления ЛКЯ бромцианом: один был представлен аминокислотными остатками 13—105 (LII), а другой (NC) состоял из N-концевого (остатки 1—17) и COOH-концевого пептидов (остатки 120—129), ковалентно связанных между собой дисульфидной связью. Фрагмент LII вызывал отчетливый Т-клеточный пролиферативный ответ, тогда как фрагмент NC индуцировал супрессию пролиферативного ответа на ТНФ-модифицированный ЛКЯ у мышей неответающей линии с гаплотипом *H-2^b*. Предварительная иммунизация неответающих *H-2^b*-мышей ЛКЯ или фрагментом NC индуцировала

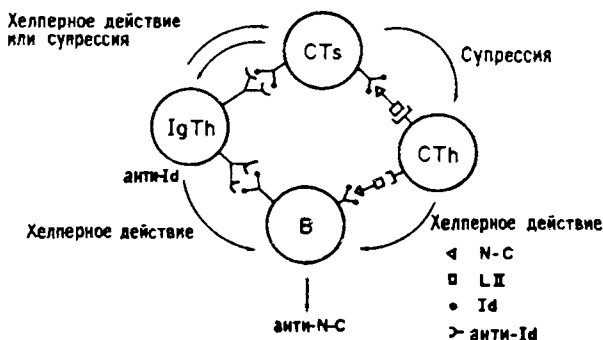


Рис. 18.13. Взаимодействия субпопуляций лимфоцитов, опосредованные распознаванием эпитопов антигена и идиотипов (по [53].)

супрессорные Т-клетки [248], а иммунизация изолированным фрагментом LII индуцировала Т-хелперы. Анализ клеток, участвующих в этой супрессорной цепи, показал, что супрессорная детерминанта NC индуцирует Т-супрессоры, которые блокируют ответ хелперных и пролиферирующих Т-лимфоцитов, распознающих эпитоп LII. Для развития супрессии необходимо взаимодействие *I-J⁺-Tsi*- и *I-J⁻-Tse*-клеток-предшественников. Супрессорные эффекторные клетки, распознающие фрагмент NC, прямо подавляют Т-хелперы, распознающие фрагмент LII ЛКЯ через антигенный мостик (когнатное распознавание) (рис. 18.13).

Кроме того, эти исследователи сообщили о другом, параллельном пути развития супрессии ответа на ЛКЯ у высокоответающей линии мышей (*H-2^a*). В этом случае В-лимфоциты образуют антитела против NC, которые несут идиотипические детерминанты узкой специфичности, общие для антител против NC и NC-распознающих Tse. Антиидиотипические хелперные Т-клетки распознают идиотип, экспрессированный на NC-специфических Tse- и В-лимфоцитах. Взаимодействие идиотипических NC-специфических Tse с антиидиотипическими хелперными Т-клетками приводит к снижению *Id⁺*-антительного ответа на NC. Таким образом, NC-специфические *Id⁺* Ts проявляют две различные супрессорные активности: а) эта клетка может подавлять LII-специфические хелперные Т-клетки в результате образования «антигенного мостика» (когнатное распознавание) и б) тот же Ts может подавлять анти-*Id* IgTh в результате идиотип-антиидиотипического взаимодействия. В этой модели выдвигается концепция двух хелперных и двух супрессорных клеток (CTh, IgTh, CTs и IgTs), действующих в антиген- и идиотип-активируемых супрессорных каскадах.

18.12.6. Контрсупрессорная цепь

Интересную регуляторную систему, подавляющую активность Ts по типу обратной связи, описали недавно Гершон и др. [249]. Т-клетки, названные «контрсупрессорами» (Tcs), экспрессируют поверхностный фенотип $Lyt-2^+$, $I-J^+$; под их влиянием Т-хелперы $Lyt-1^+$ приобретают устойчивость к эффекторным Т-супрессорам, действующим по принципу обратной связи (Tse). Индукция Tcs также зависит от присутствия других типов клеток: Т-клеток, индукторов, контрсупрессоров с поверхностным фенотипом $Lyt-2^+$, $I-J^+$ и трансдукторов с фенотипом $Lyt-1^+$, 2^+ , $I-J^+$. Продукт субобласти $I-J$, обнаруженный на контрсупрессорах, отличается от экспрессируемого клетками в системе обратной супрессии. Гершон и др. [249] предположили, что контрсупрессорная цепь симметрична цепи обратной супрессии и, вероятно, играет важную роль в предупреждении развития у животного неотвечаемости или толерантности на некоторые вредные антигены даже в том случае, когда процессы супрессии доминируют. При гипериммунных состояниях Tcs придают хелперным Т-клеткам функциональную устойчивость к супрессии.

Обобщение и заключение

Методология, использованная в этой главе для описания основных параметров, выбранных из огромного числа феноменов взаимодействий регуляторных клеток, несколько напоминает используемую в современной семиотике и семантике. В сложной феноменологии мы попытались выявить некую закономерность, знак (*signum*), и идентифицировать ее, исходя из определенных исходных моделей, или прототипов. Такими основными моделями (прототипами) клеточных взаимодействий являются а) когнатные, б) поликлональные и в) рецептор-антирецепторные взаимодействия. Кроме того, мы разделили все регуляторные Т-клетки по их способности к распознаванию на два подтипа: специфичные к носителю (CTh и CTs) и Ig-специфические Th и Ts (IgTh и IgTs). Распознавание антигенов CTh и CTs сопряжено с дополнительным осложнением, связанным с наличием у этих клеток второй распознающей структуры, специфичной к МНС-продуктам и накладывающей специфические ограничения на клеточные взаимодействия. Мы проанализировали противоречивые, но захватывающие данные о том, что генетическая рестрикция приобретается клетками в ходе их дифференцировки и антиген-зависимой селекции. Действительно, это один из наиболее спорных вопросов современной иммунологии, возникающий в связи с проблемой распознавания собственных антигенных структур. Хотя в настоящий момент на этот вопрос нет определенного ответа, мы можем интерпретировать большинство экспериментальных данных в рамках вышеупомянутых моделей и концепций, схематически представленных на рис. 18.14.

Допустим, что специализированные антиген-презентирующие клетки презентуют антиген В-лимфоцитам и CTh. Активация CTh зависит от генов *Ig*. Гены *МНС* контролируют и антиген-презентирующую способность (гл. 15), и способность Т-клеток распознавать антиген в контексте с собственными молекулами МНС. Возникшие CTh прежде всего вступают в когнатное взаимодействие с В-лимфоцитами, делая их «предрасположенными» к взаимодействию именно с этими CTh. Этот первый сигнал позволяет незрелым В-лимфоцитам дифференцироваться в клетки, несущие поверхностные иммуноглобулины разных классов. Такие В-лимфоциты могут быть восприимчивы к поликлональным хелперным влияниям Т-клеток, которые определяются растворимыми фактора-

Если мы допускаем эту сложную, но детально разработанную схему, нам следует всерьез задаться вопросом, что такое МНС-рестрикция и что из себя представляет Т-клеточный рецептор. При рассмотрении суммы экспериментальных данных, полученных в течение последних десяти лет, мы сможем понять имеющиеся противоречия только в том случае, если допустим, что Т-клетки, узнающие антиген, Ig и МНС-молекулы, обладают исключительной способностью к формированию репертуара распознавания в зависимости от условий дифференцировки. По-видимому, при распознавании антигена, Ig и МНС-молекул Т-клетка обучается взаимодействиям с соответствующими клетками-партнерами не в результате реализации обычной генетически заданной программы, а в ходе крайне пластичного, гибкого процесса. Распознающая структура Т-клеток специфична не только к самому антигену, но и к МНС и (или) Ig, и сложные структуры, образуемые комбинацией нескольких (более одной) полиморфных структур, дают непредсказуемо большое разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов. Ограничения (рестрикция) клеточных взаимодействий, прослеженные в этой главе, могут служить примером способности Т-клеток к формированию репертуара распознавания экзо- и эндо-антигенов в ходе дифференцировки и процессов адаптации. В заключение остается лишь сказать, что в ближайшем будущем возможны любые, самые неожиданные открытия в области «Т-клеточной» иммунологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller J. F. A. P. Immunological function of the thymus, *Lancet*, 2, 748 (1961).
2. Good R. A., Dalmasso A. O., Martinez C., Archer O. K., Pierce J. C., Papermaster B. W. The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice, *J. Exp. Med.*, 116, 773 (1962).
3. Miller J. F. A. P. Thymus and antigen reactive cells, *Transplant. Rev.*, 1, 3 (1969).
4. Claman H. N., Chaperon E. A. Immunological complementation between thymus and marrow cells: A model for the two-cell theory of immunocompetence, *Transplant. Rev.*, 1, 92 (1969).
5. Davies A. J. S. The thymus and cellular basis of immunity, *Transplant. Rev.*, 1, 43 (1969).
6. Rajewsky K., Schirmacher V., Nase S., Jerne N. K. The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity, *J. Exp. Med.*, 129, 1131 (1969).
7. Mitchison N. A. Immunocompetent cell populations. In: *Immunological tolerance*, ed. by M. Landy and W. Braun, p. 149, Academic Press, New York, 1969.
8. Claman H. N., Chaperon E. A., Triplet R. F. Thymus-marrow cell combinations. — synergism in antibody production, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122, 1167 (1966).
9. Miller J. F. A. P., Mitchel G. F. The thymus and the precursors of antigen-reactive cells, *Nature*, 216, 659 (1967).
10. Davies A. J. S., Leuchers E., Wallis V., Marchant R., Elliot E. B. The failure of thymus-derived cells to produce antibody, *Transplantation*, 5, 222 (1967).
11. Moller G., ed. *Transplant. Rev.*, Vol. 1 (1969).
12. Mitchell G. F., Miller J. F. A. P. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 128, 821 (1968).
13. Ovary Z., Benacerraf B. Immunological specificity of the secondary response with dinitrophenyl proteins, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 114, 72 (1963).
14. Rajewsky K., Rottander E. Tolerance specificity and immune response to lactic dehydrogenase isozymes, *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.*, 32, 547 (1967).
15. Mitchison N. A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation, *Eur. J. Immunol.*, 1, 18 (1971).
16. Mitchison N. A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. V. Use of anti-lymphocyte serum to deplete animals of helper cells, *Eur. J. Immunol.*, 1, 68 (1971).
17. Raff M. C. Two distinct populations of peripheral lymphocyte in mice distinguishable by immunofluorescence, *Immunology*, 19, 637 (1970).
18. Schirmacher V., Rajewsky K. Determination of antibody class in a system of cooperating antigenic determinants, *J. Exp. Med.*, 132, 1019 (1970).

19. Katz D. H., Paul W. E., Goidl E. A., Benacerraf B. Carrier function in anti-hapten immune responses. I. Enhancement of primary and secondary anti-hapten antibody responses by carrier preimmunization, *J. Exp. Med.*, **132**, 261 (1970).
20. Paul W. E., Katz D. H., Goidl E. A., Benacerraf B. Carrier function in anti-hapten immune responses. II. Specific properties of carrier cells capable of enhancing anti-hapten antibody responses, *J. Exp. Med.*, **132**, 283 (1970).
21. Feldmann M., Basten A. Cell interactions in the immune response in vitro. III. Specific collaboration across a cell impermeable membrane, *J. Exp. Med.*, **136**, 49 (1972).
22. Feldmann M. Cell interactions in the immune responses in vitro. V. Specific collaboration via complexes of antigen and thymus-derived cell immunoglobulin, *J. Exp. Med.*, **136**, 737 (1972).
23. Hamaoka T., Katz D. H., Benacerraf B. Hapten-specific IgE antibody responses in mice. II. Cooperative interactions between adoptively transferred T and B lymphocytes in the development of IgE response, *J. Exp. Med.*, **138**, 538 (1973).
24. Kishimoto T., Ishizaka K. Regulation of antibody response in vitro. VI. Carrier-specific helper cells for IgG and IgE antibody response, *J. Immunol.*, **111**, 720 (1973).
25. Dutton R. W., Falkoff R., Hirst J. A., Hoffmann M., Kappler J. W., Kellman J. R., Lesley J. F., Vann D. Is there evidence for a non-antigen specific diffusible chemical mediator from the thymus-derived cell in the initiation of the immune response? *Prog. Immunol.* **1**, 355 (1971).
26. Mitchison N. A., Cell populations involved in immune responses. In: *Immunological Tolerance*, ed. by M. Landy and W. Braun, p. 113, Academic Press, New York, 1969.
27. Miller J. F. A. P., Mitchell G. F. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **128**, 801 (1968).
28. Taylor R. B. Cellular cooperation in the antibody response of mice to two serum albumins: specific function of thymus cells, *Transplant. Rev.*, **1**, 114 (1969).
29. Kindred B., Shreffler D. C. H-2 dependence of cooperation between T and B cells in vivo, *J. Immunol.*, **109**, 940 (1972).
30. Katz D. H., Hamaoka T., Benacerraf B. Cell interaction between histocompatible T and B lymphocytes. II. Failure of physiologic cooperative interaction between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-carrier conjugates, *J. Exp. Med.*, **137**, 1405 (1973).
31. Erb P., Feldmann M. The role of macrophage in the generation of T helper cells. II. The genetic control of macrophage-T-cell interaction for helper cell induction with soluble antigens, *J. Exp. Med.*, **142**, 460 (1975).
32. Pierce C. W., Kapp J. A., Benacerraf B. Regulation by the H-2 gene complex of macrophage-lymphoid cell interactions in secondary antibody responses in vitro, *J. Exp. Med.*, **144**, 371 (1976).
33. Shih W. H., Matzinger P. C., Swain S. L., Dutton R. W. Analysis of histocompatibility requirements for proliferative and helper T cell activity. T cell populations depleted of alloreactive cells by negative selection, *J. Exp. Med.*, **152**, 1311 (1980).
34. Singer A. S., Hathcock K. S., Hodes R. J. Cellular and genetic control of antibody responses. V. Helper T-cell recognition of H-2 determinants on accessory cells but not B cells, *J. Exp. Med.*, **149**, 1208 (1979).
35. Swierkosz J. E., Rock K., Marrack P., Kappler J. W. The role of H-2 linked genes in helper T cell function. II. Isolation of antigen-pulsed macrophages of two separate populations of F₁ helper T cells each specific for antigen and one set of parental H-2 products, *J. Exp. Med.*, **147**, 554 (1978).
36. Tada T., Takemori T., Okumura K., Nonaka M., Tokuhisa T. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: Independent and synergistic effects of Ia⁻ and Ia⁺ helper T cells, *J. Exp. Med.*, **147**, 446 (1978).
37. Janeway C. A., Bert D. L., Shen F.-W. Cell cooperation during in vivo anti-hapten antibody responses. V. Two synergistic Ly-1⁺23⁻ T cells with distinctive specificities, *Eur. J. Immunol.*, **10**, 231 (1980).
38. Marrack P. C., Kappler J. W. Antigen-specific and nonspecific mediators of T cell/B cell cooperation. I. Evidence for their production by different T cells, *J. Immunol.*, **114**, 1116 (1975).
39. Lefkowitz I., Waldmann H. Heterogeneity of B cells reacting with T cell factors. Evidence for matching T cell and B cell subsets, *Immunology*, **39**, 915 (1977).
40. Imperiale M. J., Faherty D. A., Sproviero J. F., Zauderer M. Functionally distinct helper T cells enriched under different culture conditions cooperative with different B cells, *J. Immunol.*, **129**, 1843 (1982).
41. McDougal F., Shen F. W., Cort S. P., Bard J. Two Ly-1 T helper cell subsets distinguished by Qa-1 phenotype. The priming environment determines whether one or both subset will be generated, *J. Exp. Med.*, **155**, 831 (1982).

42. Jacobson E. B., Herzenberg L. A., Riblet R. J., Herzenberg L. A. Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis. I. Chronic suppression following perinatal exposure to material antibody to parental allotypic (SJL $\times$ BALB/c) F_1 mice, *J. Exp. Med.*, 135, 1163 (1972).
43. Herzenberg L. A., Chan E. L., Ravitch M. M., Riblet R. J., Herzenberg L. A. Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis. III. Identification of T cells as responsible for suppression by cells from spleen, thymus, lymph node and bone marrow, *J. Exp. Med.*, 137, 1311 (1973).
44. Okumura K., Herzenberg L. A., Murphy D. B., McDevitt H. O., Herzenberg L. A. Selective expression of H-2 (I-region) loci controlling determinants on helper and suppressor T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 144, 685 (1976).
45. Herzenberg L. A., Black S. J., Tokuhisa T., Herzenberg L. A. Memory B cell at successive stages of differentiation: Affinity maturation and the role of IgD receptors, *J. Exp. Med.*, 151, 1071 (1980).
46. Janeway C. A., Jr. Cellular cooperation during in vivo anti-hapten antibody responses. I. The effect of cell number on the response, *J. Immunol.*, 114, 1394 (1975).
47. Janeway C. A., Jr., Rurgita R. A., Weinbaum F. I., Asofsky R., Wigzell H. Evidence for an immunoglobulin-dependent antigen-specific helper T cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4582 (1977).
48. Bottomly K., Janeway C. A., Mathieson B. J., Mosier D. E. Absence of an antigen-specific helper T cell required for the expression of the T 15 idiotype in mice treated with anti- μ antibody, *Eur. J. Immunol.*, 10, 159 (1980).
49. Bottomly K., Mosier D. E. Mice whose B cells cannot produce the T 15 idiotype also lack an antigen-specific helper T cell required for T 15 expression, *J. Exp. Med.*, 150, 1399 (1979).
50. Zauderer M., Sproviero J. F., Cosenza H., Imperiale M. J. Cooperative subsets of antigen-specific helper T cells, In: *Regulatory T Lymphocytes*, ed. by B. Pernis and H. J. Vogel, p. 185, Academic Press, New York 1980.
51. Woodland R., Cantor H. Idiotype specific T helper cells are required to induce idiotype positive B memory cells to secrete antibody, *Eur. J. Immunol.*, 8, 600 (1978).
52. Nisonoff A., Ju S.-T., Owen F. L. Studies of structure and immunosuppression of a cross-reactive idiotype in strain A mice, *Immunol. Rev.*, 34, 89 (1977).
53. Sercarz E. E., Yowell R. L., Turkin D., Miller A., Araneo B. A., Adorini L. Different functional specificity repertoire for suppressor and helper T cells, *Immunol. Rev.*, 39, 108 (1978).
54. Adorini L., Harvey M. A., Sercarz E. E. The fine specificity of regulatory T cells. IV. Idiotype complementary and antigen-binding interactions in the anti-lysozyme response, *Eur. J. Immunol.*, 9, 906 (1979).
55. Eichmann K., Rajewsky K. Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody, *Eur. J. Immunol.*, 5, 661 (1975).
56. Hetzelberger D., Eichmann K. Recognition of idiotypes in lymphocyte interactions. I. Idiotypic selectivity of the cooperation between T and B lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, 8, 846 (1978).
57. Katz D. H., Hamaoka T., Dorf M. E., Benacerraf B. Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. III. Demonstration that the H-2 complex determines successful physiologic lymphocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2624 (1973).
58. Katz D. H., Chiorazzi N., McDonald J., Katz L. R. Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. VII. Cooperative response between lymphocytes are controlled by genes in the I region of H-2 complex, *J. Exp. Med.*, 141, 263 (1975).
59. Katz D. H. The role of the histocompatibility gene complex in lymphocyte differentiation, *Transplant. Proc.*, 8, 405 (1976).
60. Swain S. L., Trefts P. E., Tse Y. S., Dutton R. W. The significance of T-B collaboration across haplotype barriers, *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 41, 597 (1977).
61. Waldmann H., Pope H., Brent L., Bighouse K. Influence of the major histocompatibility complex on lymphocyte interactions in antibody formation, *Nature*, 274, 166 (1978).
62. Kappler J. W., Marrack P. The role of H-2 genes in helper T cell function. IV. Importance of T cell genotype and host environment in I region and Ir gene expression, *J. Exp. Med.*, 148, 1510 (1978).
63. Sprent J., von Boehmer H. T helper function of parent F_1 chimeras. Presence of separate T cell subgroups able to stimulate allogeneic B cells but not syngeneic B cells, *J. Exp. Med.*, 149, 387 (1979).
64. Singer A., Hathcock K. S., Hodes R. J. Cellular and genetic control of antibody response. V. Helper T cell recognition of H-2 determinants on accessory cells but not B cells, *J. Exp. Med.*, 149, 1208 (1979).
65. von Boehmer H., Hudson L., Sprent J. Collaboration of histocompatible T and B lymphocytes using cells from tetraparental bone marrow chimeras, *J. Exp. Med.*, 142, 989 (1975).

66. Bechtol K. B., Freed J. H., Herzenberg L. A., McDevitt H. O. Genetic control of antibody response to poly-L(Tyr, Glu)-poly D,L-Ala-poly L-Lys in C3H CWB tetraparental mice, *J. Exp. Med.*, **140**, 1660 (1974).
67. Erb P., Meier B., Matsunaga T., Feldmann M. Nature of T cell-macrophage interaction in helper cell induction in vitro. II. Two stages of T helper cell differentiation analysed in irradiation and allophenic chimeras, *J. Exp. Med.*, **149**, 686 (1979).
68. Sprent J., von Boehmer H. Helper function of T cells depleted of alloantigen-reactive lymphocytes by filtration through irradiated F₁ hybrid recipients. I. Failure to collaborate with allogeneic B cells in a secondary response to sheep erythrocytes measured in vivo, *J. Exp. Med.*, **144**, 617 (1976).
69. Waldmann H., Pope H., Munro A. J. Cooperation across the histocompatibility barrier: H-2^d T cells primed to antigen in H-2^k environment can cooperate with H-2^k B cells, *J. Exp. Med.*, **144**, 1707 (1976).
70. Sprent J. Restricted helper function of F₁ hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. I. Failure to collaborate with B cells of the opposite parental strain not associated with active suppression, *J. Exp. Med.*, **147**, 1159 (1978).
71. Sprent J. Restricted helper function of F₁ hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. II. Evidence for restrictions effecting helper cell induction and T-B collaboration, both mapping to the K-end of the H-2 complex, *J. Exp. Med.*, **147**, 1838 (1978).
72. Sprent J. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice measured in vivo, *Immunol. Rev.*, **42**, 108 (1978).
73. Waldmann H., Pope H., Bottles C., Davies A. J. S. The influence of the thymus on the development of MHC restrictions exhibited by T helper cells, *Nature*, **277**, 137 (1979).
74. 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.*, **147**, 882 (1978).
75. Bevan M. J. In a radiation chimera host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells, *Nature*, **269**, 417 (1977).
76. Miller J. F. A. P. Restrictions imposed on T lymphocyte reactivities by the major histocompatibility complex: Implications for T cell repertoire selection, *Immunol. Rev.*, **42**, 76 (1978).
77. Katz D. H. Adoptive differentiation of lymphocytes: Theoretical implications for mechanisms of cell-cell recognition and regulation of immune responses, *Adv. Immunol.*, **29**, 138 (1980).
78. Katz D. H., Skidmore B. J., Katz L. R., Bogowitz C. A. Adaptive differentiation of murine lymphocytes. I. Both T and B lymphocyte differentiations in F₁-parental chimeras manifest preferential cooperative activity for partner lymphocytes derived from the same parental type corresponding to the chimeric host, *J. Exp. Med.*, **148**, 727 (1978).
79. Katz D. H., Katz L. R., Bogowitz C. A., Borgatze R. F. The major influence on helper T cell cooperative partner cell preference is exerted by extrathymic environment, *J. Immunol.*, **124**, 1750 (1980).
80. Yamashita U., Shevach E. M. The histocompatibility restrictions on macrophage T helper cell interaction determine the histocompatibility restrictions on T helper cell B cell interaction, *J. Exp. Med.*, **148**, 1171 (1978).
81. Singer A., Asano Y., Shigeta M., Hathcock K. S., Ahmed A., Fathmann C. G., Hodes R. J. Distinct B cell populations differ in their genetic requirements for activation by T helper cells, *Immunol. Rev.*, **64**, 137 (1981).
82. Kappler J. W., Marrack P. C. Helper T cells recognize antigen and macrophage surface components simultaneously, *Nature*, **262**, 797 (1976).
83. Katz D. H., Dorf M. E., Benacerraf B. Control of T lymphocyte and B lymphocyte activation by two complementing Ir-GLØ immune response genes, *J. Exp. Med.*, **143**, 906 (1976).
84. Hodes R. J., Hathcock K. S., Singer A. Major histocompatibility complex-restricted self recognition. A monoclonal anti-I-A^k reagent blocks helper T cell recognition of major histocompatibility complex determinants, *J. Exp. Med.*, **152**, 1779 (1980).
85. Niederhuber J. E., Allen P. Role of I region gene products in macrophage-induction of antibody response. II. Restriction at the level of T cell recognition of I-J subregion macrophage determinants, *J. Exp. Med.*, **151**, 1103 (1980).
86. Paul W. E., Benacerraf B. Functional specificity of thymus-dependent lymphocytes, *Science*, **195**, 1293 (1977).
87. Erb P., Feldmann M. The role of macrophage in the generation of helper T cells. III. Influence of macrophage derived factors in helper cell induction, *Eur. J. Immunol.*, **5**, 759 (1975).

88. Erb P., Feldmann M., Hogg N. The role of macrophage in the generation of helper T cells. IV. Nature of genetically related factor derived from macrophage incubated with soluble antigen, *Eur. J. Immunol.*, **6**, 365 (1976).
89. Lonai P., Puri J., Bitton S., Ben-Neriah Y., Givol D., Hammerling G. H-2 restricted helper factor secreted by cloned hybridoma cells, *J. Exp. Med.*, **154**, 942 (1981).
90. Mizel S. B. Interleukin 1 and T cell activation, *Immunol. Rev.*, **63**, 51 (1982).
91. Keller D. M., Swierkosz J. E., Marrack P., Kappler J. Two types of functionally distinct, synergizing helper T cells, *J. Immunol.*, **124**, 1350 (1980).
92. Waldmann H., Lefkowitz I., Quintans J. Limiting dilution analysis of helper T cell function, *Immunology*, **28**, 1135 (1975).
93. Waldmann H., Pope H., Lefkowitz I. Limiting dilution analysis of helper T cell function. II. An approach to the study of the function of single helper T cells, *Immunology*, **31**, 343 (1976).
94. Waldmann H., Lefkowitz I., Feinstein A. Restriction in the functions of single helper T cells, *Immunology*, **31**, 353 (1976).
95. Waldmann H. Conditions determining the generation and expression of T helper cells, *Immunol. Rev.*, **35**, 121 (1976).
96. Eichmann K., Falk I., Melchers I., Simon M. M. Quantitative studies on T cell diversity, *J. Exp. Med.*, **152**, 477 (1980).
97. Watson J. Continuous proliferation of murine antigen-specific helper T lymphocytes in culture, *J. Exp. Med.*, **150**, 1510 (1979).
98. Sproviero J. F., Imperiale M. J., Zauderer M. Clonal analysis of F₁ hybrid helper T cells restricted to parental or F₁ hybrid major histocompatibility determinants, *J. Exp. Med.*, **152**, 920 (1980).
99. Sproviero J. F., Imperiale M. J., Zauderer M. Clonal analysis of F₁ hybrid helper T cells. I-A subregion-encoded hybrid determinants restrict the activity of keyhole limpet hemocyanin-specific helper T cells, *J. Exp. Med.*, **154**, 1255 (1981).
100. Marrack P., Kappler J. W. The role of H-2 linked genes in helper T cell function. VII. Expression of I region and immune response genes by B cells in bystander help assays, *J. Exp. Med.*, **152**, 1274 (1980).
101. Schimpl A., Wecker E. Replacement of T cell function by a T cell product, *Nature*, **237**, 15 (1972).
102. Rubin A. S., Coons A. H. Specific heterologous enhancement of immune response. III. Partial characterization of supernatant material with enhancing activity, *J. Immunol.*, **108**, 1597 (1972).
103. Watson J. The role of humoral factors in the initiation of in vitro primary immune responses. III. Characterization of factors that replace thymus-derived cells, *J. Immunol.*, **111**, 1301 (1973).
104. Gorzynski R. M., Miller R. G., Phillips R. A. Reconstitution of T-cell-depleted spleen cell populations by factors derived from T cells. III. Mechanism of action of T cell derived factors, *J. Immunol.*, **111**, 900 (1973).
105. Kishimoto T., Ishizaka K. Regulation of antibody response in vitro. VII. Enhancing soluble factors for IgG and IgE antibody response, *J. Immunol.*, **111**, 1194 (1973).
106. Armerding D., Katz D. H. Activation of T and B lymphocytes in vitro. II. Biological and biochemical properties of an allogeneic effect factor (AEF) active in triggering specific B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **140**, 19 (1974).
107. Takatsu K., Tominaga A., Hamaoka T. Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on TRF production, *J. Immunol.*, **124**, 2414 (1980).
108. Howard M., Farrar J., Hilsfiker M., Johanson B., Takatsu K., Hamaoka T., Paul W. E. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **155**, 914 (1982).
109. Parker D. C. Separable helper factors support B cell proliferation and maturation to Ig secretion, *J. Immunol.*, **129**, 469 (1982).
110. Hartman K. U. Induction of a hemolysin response in vitro. Interaction of cells of bone marrow origin and thymic origin, *J. Exp. Med.*, **132**, 1267 (1970).
111. Delovitch T. L., McDevitt H. O. In vitro analysis of allogeneic lymphocyte interaction. I. Characterization and cellular origin of an Ia-positive helper factor-allogeneic effect factor, *J. Exp. Med.*, **146**, 1019 (1977).
112. Schimpl A., Wecker E. Nonantigen-specific lymphokines in T cell-B cell cooperation. In: *Biology of the Lymphokines*, ed. by S. Cohen, E. Pick, and J. Oppenheim, p. 369, Academic Press, New York, 1979.
113. Takatsu K., Hamaoka T. DBA/2Ha mice as a model of an X-linked immunodeficiency which is defective in the expression of TRF-acceptor site(s) on B lymphocytes, *Immunol. Rev.*, **64**, 25 (1982).

114. Greenstein J. L., Lord E., Kappler J., Marrack P. Analysis of the response of B cells from CBA/N defective mice to nonspecific help, *J. Exp. Med.*, **154**, 1608 (1981).
115. Swain S. L., Wetzel G. D., Soubiran P., Dutton R. W. T cell replacing factors in the B cell response to antigen, *Immunol. Rev.*, **63**, 111 (1982).
116. Okada M., Yoshimura N., Kaieda T., Yamamura Y., Kishimoto T. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7717 (1981).
117. Schreier M. H., Andersson J., Lernhardt W., Melchers F. Antigen-specific T-helper cells stimulate H-2-compatible and H-2-incompatible B-cell blasts polyclonally, *J. Exp. Med.*, **151**, 194 (1980).
118. Andersson J., Schreier M. H., Melchers F. T cell-dependent B cell stimulation is H-2-restricted and antigen-dependent only at the resting B cell level, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1612 (1981).
119. Melchers F., Andersson J., Lernhardt W., Schreier M. H-2 unrestricted polyclonal maturation without replication of small B cells induced by antigen activated T cell help factors, *Eur. J. Immunol.*, **10**, 679 (1980).
120. Andersson J., Melchers F. T cell-dependent activation of resting B cells: Requirement for both nonspecific unrestricted and antigen-specific Ia restricted soluble factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2497 (1981).
121. Lernhardt W., Corbel R. W., Wall R., Melchers F. T cell hybridomas which produce B lymphocyte replication factor only, *Nature*, **300**, 355 (1982).
122. Yoshizaki K., Nakagawa T., Muraguchi A., Yamamura Y., Kishimoto T. Induction of proliferation and Ig production in human B leukemia cells by anti-immunoglobulin and T cell factors, *J. Immunol.*, **128**, 1296 (1982).
123. Leibson J., Marrack P., Kappler J. W. B cell helper factors. I. Requirement for both interleukin 2 and another 40,000 mol wt factor, *J. Exp. Med.*, **154**, 1681 (1981).
124. Swain S. L., Dennert G., Warner J. F., Dutton R. W. Culture supernatant of a stimulated T-cell line have helper activity that acts synergistically with interleukin 2 in the response of B cells to antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2517 (1981).
125. Feldmann M., Nossal G. J. V. Tolerance enhancement and regulation of interactions between T cells, B cells and macrophages, *Transplant. Rev.*, **13**, 3 (1972).
126. Taussig M. J. T cell factor which can replace T cells in vivo, *Nature*, **284**, 234 (1974).
127. Taussig M. J., Munro A. J. Specific co-operative T cell factor: removal by anti-H-2 but not by anti-Ig sera, *Nature*, **251**, 63 (1974).
128. Taussig M. J., Munro A. J., Campbell R., David C. S., Staines N. A. Antigen-specific T cell factor in cell cooperation. Mapping within the I region of the H-2 complex and ability to cooperate across allogeneic barriers, *J. Exp. Med.*, **142**, 694 (1975).
129. Mozes E., Isac R., Taussig M. J. Antigen-specific T cell factors in the genetic control of the immune response to poly(Tyr, Glu)-poly(DLAla-polyLys. Evidence for T- and B-cell defects in SJL mice, *J. Exp. Med.*, **141**, 703 (1975).
130. Munro A. J., Taussig M. J. Two genes in the major histocompatibility complex control immune response, *Nature*, **256**, 103 (1975).
131. Howie S., Feldmann M. In vitro studies on H-2 linked unresponsiveness to synthetic polypeptides. III. Production of an antigen-specific T helper cell factor to (T,G)-A—L. *Eur. J. Immunol.*, **7**, 417 (1977).
132. Kontiainen S., Feldmann M. Suppressor cell induction in vitro. III. Antigen-specific suppression by supernatants of suppressor cells, *J. Immunol.*, **7**, 310 (1977).
133. Tada T., Okumura K. The role of antigen-specific T cell factors in the regulation of the immune response, *Adv. Immunol.*, **28**, 1 (1979).
134. Taussig M. J. Antigen-specific T cell factors, *Immunology*, **41**, 759 (1980).
135. Germain R. N., Benacerraf B. Helper and suppressor factors, *Springer Sem. Immunopathol.*, **3**, 93 (1980).
136. Feldmann M., Kontiainen S. The role of antigen-specific T-cell factors in the immune response. In: *Lymphokine*, Vol. 2, ed. by E. Pick, p. 87, Academic Press, New York, 1981.
137. Eshhar Z. Functional T cell hybridomas producing antigen-specific immunoregulatory factors. In: ed. by D. Katz, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
138. Feldmann M. Immunogenicity in vitro. Structural correlation, *Contemp. Top. Mol. Immunol.*, **3**, 57 (1974).
139. Mozes E. Some properties and functions of antigen-specific T cell factors. In: *Ir Genes and Ia Antigens*, ed. by H. O. McDevitt, p. 475, Academic Press, New York, 1978.
140. Shiozawa C., Singh B., Rubenstein S., Diener E. Molecular control of B cell triggering by antigen-specific T cell-derived helper factor, *J. Immunol.*, **118**, 2199 (1977).
141. Eshhar Z., Aple R. N., Lowy I., Ben-Neriah Y., Givol D., Mozes E. T cell hybridoma bearing heavy chain variable region determinants producing (T,G)-A—L specific factors, *Nature*, **286**, 270 (1980).

142. *Lonai P., Puri J., Hammerling G. J.* H-2 restricted antigen binding by a hybridoma clone that produces antigen-specific helper factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 549 (1981).
143. *Taniguchi M., Hayakawa K., Tada T.* Properties of antigen-specific suppressive T cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. II. In vitro activity and evidence for the I-region gene product, *J. Immunol.*, **116**, 542 (1976).
144. *Tokuhiya T., Taniguchi M., Okumura K., Tada T.* An antigen-specific I region gene product that augments the antibody response, *J. Immunol.*, **120**, 414 (1978).
145. *Hiramatsu K., Miyatani S., Kim M., Yamada S., Okumura K., Tada T.* Unique T cell Ia antigen expressed on a hybrid cell line producing antigen specific augmenting T cell factor, *J. Immunol.*, **127**, 1118 (1981).
146. *Spurll G. M., Owen F.* A family of T cell alloantigens linked to Igh-1, *Nature*, **293**, 742 (1981).
147. *Horiuchi A., Waksman B. H.* Role of the thymus in tolerance. VIII. Relative effectiveness of nonaggregated and heat aggregated bovine γ globulin, injected directly into lymphoid organs of normal rats, in suppressing immune responsiveness, *J. Immunol.*, **101**, 1322 (1968).
148. *Gershon R. K., Kondo K.* Cell interaction in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes, *Immunology*, **18**, 723 (1970).
149. *Gershon R. K., Kondo K.* Infectious immunological tolerance, *Immunology*, **21**, 903 (1972).
150. *McCullagh P. J.* The abrogation of immunological tolerance by means of allogeneic conformation, *Transplant. Rev.*, **12**, 180 (1972).
151. *Baker P. J., Barth R. F., Stashak P. W., Amsbaugh D. F.* Enhancement of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice treated with antilymphocyte serum, *J. Immunol.*, **104**, 1313 (1970).
152. *Baker P. J., Stashak P. W., Amsbaugh D. F., Prescott B., Barth R. F.* Evidence for the existence of two functionally distinct types of cells which regulate the antibody response to type III Pneumococcal polysaccharide, *J. Immunol.*, **105**, 1581 (1970).
153. *Tada T., Taniguchi M., Okumura K.* Regulation of homocytotropic antibody response in the rat. II. Effect of X-irradiation, *J. Immunol.*, **106**, 1012 (1971).
154. *Okumura K., Tada T.* Regulation of homocytotropic antibody response in the rat. III. Effect of thymectomy and splenectomy, *J. Immunol.*, **106**, 1019 (1971).
155. *Okumura K., Tada T.* Regulation of homocytotropic antibody response in the rat. VI. Inhibitory effect of thymocyte on the homocytotropic antibody response, *J. Immunol.*, **107**, 1682 (1971).
156. *Gershon R. K.* T-cell control of antibody production, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **3**, 1 (1974).
157. *Basten A., Miller J. F. A. P., Johnson P.* T-cell dependent suppression of an anti-hapten antibody response, *Transplant. Rev.*, **26**, 130 (1975).
158. *Weigle W. O., Sieckmann O. G., Doyle M. V., Chiller J. M.* Possible roles of suppressor cells in immunological tolerance, *Transplant. Rev.*, **26**, 186 (1975).
159. *Tada T., Taniguchi M., Takemori T.* Properties of primed suppressor T cells and their products, *Transplant. Rev.*, **26**, 106 (1975).
160. *Benacerraf B., Kapp J. A., Debre P., Pierce C. W., de la Croix F.* The stimulation of specific suppressor T cells in genetic nonresponder mice by linear copolymer of L-amino acid, *Transplant. Rev.*, **26**, 21 (1975).
161. *Fujimoto S., Greene M. I., Schon A.* Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing host, *J. Immunol.*, **116**, 791 (1976).
162. *Moller G.* Induction of antigenic competition with thymus-dependent antigens: Effect of OVA synthesis in spleen cells, *J. Immunol.*, **106**, 1566 (1971).
163. *Zembala M., Asherson G. L.* Depression of the T cell phenomenon of contact sensitivity by T cells from unresponsive mice, *Nature*, **244**, 227 (1978).
164. *Cantor H., Boyse E. A.* Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular differentiation, *Immunol. Rev.*, **32**, 105 (1977).
165. *Cantor H., Gershon R. K.* (1979). Immunological circuits: Cellular composition, *Fed. Proc.*, **38**, 2058 (1979).
166. *Gershon R. K.* Immunoregulation circa 1980: Some comments on the state of the art, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **66**, 18 (1980).
167. *Herzenberg L. A., Black S. J., Herzenberg L. A.* Regulatory circuit and antibody responses, *Eur. J. Immunol.*, **10**, 1 (1980).
168. *Waltenbough C.* Specific and nonspecific suppressor T cell factors. In: *Biology of the Lymphokines*, ed. by S. Cohen, E. Pick, and J. Oppenheim, p. 421, Academic Press, New York, 1979.
169. *Pross H. F., Eidinger D.* Antigenic competition: A review of nonspecific antigen-induced suppression, *Adv. Immunol.*, **18**, 133 (1974).
170. *Liacopoulos P., Ben-Efreim S.* Antigenic competition, *Prog. Allergy*, **18**, 97 (1975).

171. Moller G. Suppressive effect of graft versus host reactions on the immune response to heterologous red cells, *Immunology*, **106**, 1566 (1971).
172. Rich S. S., Rich R. R. Regulatory mechanisms in cell mediated immune response. I. Regulation of mixed lymphocyte reactions by alloantigen-activated thymus-derived lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **140**, 1588 (1974).
173. Dutton R. W. Inhibitory and stimulatory effects of concanavalin A on the response of mouse spleen suspensions to antigen. I. Characterization of inhibitory cell activity, *J. Exp. Med.*, **136**, 1445 (1972).
174. Rich R. R., Pierce C. W. Biological expression of lymphocyte activation. II. Generation of a population of thymus-derived suppressor lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **137**, 649 (1973).
175. Pierce C., Kapp J. Regulation of immune response by suppressor T cells, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **5**, 91 (1976).
176. Dutton R. W. Inhibitory and stimulatory effects of Concanavalin A on the response of mouse spleen cells to antigen. II. Evidence for separate stimulatory and inhibitory cells, *J. Exp. Med.*, **138**, 1496 (1973).
177. Rich R. R., Pierce C. W. Biological expression of lymphocyte activation. III. Suppression of plaque forming cell responses in vitro by supernatant fluids from Concanavalin A activated spleen cell culture, *J. Immunol.*, **112**, 1360 (1974).
178. Tadakuma T., Pierce C. W. Mode of action of immune response suppressor (SIRS) produced by Concanavalin A-activated spleen cells, *J. Immunol.*, **120**, 481 (1978).
179. Aune T. M., Pierce C. W. Mechanism of action of macrophage-derived suppressor factor produced by soluble immune response suppressor treated macrophages, *J. Immunol.*, **127**, 368 (1981).
180. Nachtigal D., Zan-Bar I., Feldmann M. The role of specific suppressor T cells in immune tolerance, *Transplant. Rev.*, **26**, 87 (1975).
181. Basten A., Miller J. F. A. P., Sprent J., Cheers C. Cell-to-cell interaction in the immune response. X. T-cell dependent suppression in tolerant mice, *J. Exp. Med.*, **140**, 199 (1974).
182. Benjamin D. C. Evidence for specific suppression in the maintenance of immunological tolerance, *J. Exp. Med.*, **141**, 635 (1975).
183. Parks D. E., Weigle W. O. Regulation of B cell unresponsiveness by suppressor cells, *Immunol. Rev.*, **43**, 217 (1979).
184. Kolsh E., Stumpf R., Weber G. Low zone tolerance and suppressor T cells, *Transplant. Rev.*, **26**, 56 (1975).
185. Baker P. J. Homeostatic control of antibody response: A model based on the recognition of cell-associated antibody by regulatory T cells, *Transplant. Rev.*, **26**, 3 (1975).
186. Benacerraf B., Waltenbaugh C., Theze J., Kapp J. A., Dorf M. The I region genes in genetic regulation. In: *Immune System: Genetics and Regulation*, ed. by E. E. Sercarz, L. A. Herzenberg, and C. F. Fox, p. 363, Academic Press, New York, 1975.
187. Eichmann K. Idiotype suppression. II. Amplification of suppressor T cell with anti-idiotypic activity, *Eur. J. Immunol.*, **5**, 511 (1975).
188. Owen F. L., Ju S.-T., Nisonoff A. Presence on idiotype specific suppressor T cells of receptors that interact with molecules bearing the idiotype, *J. Exp. Med.*, **145**, 1559 (1977).
189. Dohi Y., Nisonoff A. Suppression of idiotype and generation of suppressor T cells with idiotype conjugated thymocytes, *J. Exp. Med.*, **150**, 909 (1979).
190. Sy M.-S., Bach B. A., Brown A. R., Benacerraf B., Nisonoff A., Greene M. I. Antigen- and receptor-driven regulatory mechanisms. II. Induction of suppressor T cells with idiotype coupled syngeneic spleen cells, *J. Exp. Med.*, **150**, 1229 (1979).
191. Sy M.-S., Dietz M. H., Germain R. N., Benacerraf B., Greene M. I. Antigen and receptor-driven regulatory mechanisms. IV. Idiotype bearing I-J⁺ suppressor T cell factors (TsF) induce second order suppressor T cells (Ts2) which express anti-idiotypic receptors, *J. Exp. Med.*, **151**, 1183 (1980).
192. Weinberger J. Z., Benacerraf B., Dorf M. E. Hapten-specific T-cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. III. Interactions of effector suppressor T cells are restricted by I-A and Igh-V genes, *J. Exp. Med.*, **151**, 1413 (1980).
193. Sunday M. E., Benacerraf B., Dorf M. E. Hapten-specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. VIII. Suppressor cell pathways in cutaneous sensitivity responses, *J. Exp. Med.*, **153**, 811 (1981).
194. Sherr D. H., Ju S.-T., Dorf M. E. Hapten-specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. XII. Fine specificity of anti-idiotypic suppressor T cells (Ts2), *J. Exp. Med.*, **153**, 640 (1981).
195. Herzenberg L. A., Herzenberg L. A. Short-term and chronic allotype suppression in mice, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **3**, 41 (1974).
196. Okumura K., Metzler C. M., Tsu T. T., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A. Two stages of B cell memory development with different T cell requirement, *J. Exp. Med.*, **144**, 345 (1976).

197. Tada T., Okumura K., Taniguchi M. Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. VIII. An antigen-specific T cell factor that regulates anti-hapten homocytotropic antibody response, *J. Immunol.*, 111, 952 (1973).
198. Tada T., Taniguchi M., David C. S. Properties of the antigen-specific suppressive T cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. IV. Special subregion assignment of the gene(s) that codes for the suppressive T cell factor in the H-2 histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, 144, 713 (1976).
199. Tada T., Taniguchi M., Tokuhi T. Suppressive T cell factor and its acceptor expressed on different subsets of T cells: A possible amplification loop in the suppressor system. In: *Ir Genes and Ia Antigens*, ed. by H. O. McDevitt, p. 517, Academic Press, New York, 1978.
200. Tada T., Taniguchi M., Takemori T. The role of receptors for T cell products in antibody formation, *Immunol., Commun.*, 5, 717 (1976).
201. Kapp J. A. Immunosuppressor factor(s) extracted from lymphoid cells of nonresponder mice primed with L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-tyrosine¹⁰ (GAT). IV. Lack of strain restriction among allogeneic nonresponder donors and recipients, *J. Exp. Med.*, 147, 997 (1975).
202. Kapp J. A., Pierce C. W., Benacerraf B. Immunosuppressive factor(s) extracted from lymphoid cells of nonresponder mice primed with L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT). II. Cellular source and effect on responder and nonresponder mice, *J. Exp. Med.*, 145, 828 (1977).
203. Kapp J. A., Pierce C. W., De La Croix F., Benacerraf B. Immunosuppressive factor(s) extracted from lymphoid cells of nonresponder mice primed with L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT). I. Activity and antigen specificity, *J. Immunol.*, 116, 305 (1976).
204. Waltenbaugh C., Debre P., Theze J., Benacerraf B. Immunosuppressive factor(s) specific for L-glutamic acid⁶⁰-L-tyrosine⁵⁰ (GT). I. Production, characterization and lack of H-2 restriction for activity in recipient strain, *J. Immunol.*, 118, 2073 (1977).
205. Theze J., Waltenbaugh C., Dorf M. E., Benacerraf B. Immunosuppressive factor(s) for L-glutamic acid⁶⁰-L-tyrosine⁵⁰ (GT). II. Presence of I-J determinants on the GT-suppressive factor, *J. Exp. Med.*, 146, 287 (1977).
206. Theze J., Kapp J. A., Benacerraf B. Immunosuppressive factor(s) extracted from lymphoid cells of nonresponder mice with L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT). III. Immunochemical properties of the GAT-specific suppressive factor, *J. Exp. Med.*, 145, 839 (1977).
207. Germain R., Benacerraf B. Antigen-specific T cell-mediated suppression. III. Induction of antigen-specific suppressor T cells (Ts2) in L-glutamic acid⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ (GAT) responder mice by nonresponder-derived GAT-suppressor factor (GAT-TsF), *J. Immunol.*, 121, 608 (1978).
208. Feldmann M., Howie S., Kontiainen S. Antigen-specific regulatory factors in the immune response. In: *Biology of the Lymphokines*, ed. by S. Cohen, E. Pick, and J. J. Oppenheim, p. 391, Academic Press, New York, 1979.
209. Kontiainen S., Feldmann M. Suppressor-cell induction in vitro. IV. Target of antigen-specific suppressor factor and its genetics relationships, *J. Exp. Med.*, 147, 110 (1978).
210. Kontiainen S., Howie S., Maurer P. H., Feldmann M. Suppressor cell induction in vitro. VI. Production of suppressor factors to synthetic polypeptides GAT and (T, G)-A-L from cells of responder and nonresponder mice, *J. Immunol.*, 122, 253 (1979).
211. Yamauchi K., Murphy D., Cantor H., Gershon R. K. Analysis of antigen-specific, Ig restricted cell free material made by I-J⁺ Ly-1 cells (Ly-1, TsF) that induces Ly-2⁺ cells to express suppressor activity, *Eur. J. Immunol.*, 11, 905 (1981).
212. Yamauchi K., Murphy D., Cantor H., Gershon R. K. Analysis of an antigen-specific, H-2 restricted cell-free product(s) made by «I-J⁺» Ly-2 cells (Ly-2, TsF) that suppress Ly-2 cell-depleted spleen cell activity, *Eur. J. Immunol.*, 11, 913 (1981).
213. Yamauchi K., Chao N., Murphy D. B., Gershon R. K. Molecular composition of an antigen-specific Ly-1 T suppressor inducer factor: one molecule binds antigen and is I-J⁺; another is I-J⁺, does not bind antigen, and imparts Igh-variable region linked restriction, *J. Exp. Med.*, 155, 655 (1982).
214. Flood P., Yamauchi K., Gershon R. K. Analysis of the interactions between two molecules that are required for the expression of Ly-2 suppressor cell activity, *J. Exp. Med.*, 156, 361 (1982).
215. Fathman C. G., Fitch F. W., eds. *Isolation, Characterization and Utilization of T Lymphocyte Clones*, Academic Press, New York, 1982.
216. Feldmann M., Schreier M., eds. *Lymphokine*, Vol. 5, Academic Press, New York, 1982.
217. Taniguchi M., Saito T., Tada T. Antigen-specific suppressor factor produced by a transplantable I-J bearing T cell hybridoma, *Nature*, 278, 555 (1979).

218. Tokuhisa T., Taniguchi M. Two distinct allotypic determinants on the antigen-specific suppressor and enhancing T cell factors that are encoded by genes linked to the immunoglobulin heavy chain locus, *J. Exp. Med.*, **155**, 126 (1982).
219. Taniguchi M., Tokuhisa T., Kanno M., Yaoita Y., Shimizu A., Honjo T. Reconstitution of antigen-specific suppressor activity with translation products of mRNA, *Nature*, **298**, 172 (1982).
220. Taussig M. J., Corvalan J. R. F., Holliman A. Characterization of an antigen-specific factor from a hybrid T cell line, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **332**, 316 (1979).
221. Minami M., Okuda K., Furusawa S., Benacerraf B., Dorf M. E. Analysis of T cell hybridomas. I. Characterization of H-2- and Igh-restricted monoclonal suppressor factors, *J. Exp. Med.*, **154**, 1390 (1981).
222. Kontiainen S., Cecka J. M., Culbert E., Stimpson E., Feldmann M. T cell hybrids producing antigen-specific factors. In: *Protides of the Biological Fluids*, Vol. 28, ed. by H. Peters, p. 451, Pergamon Press, Oxford, 1980.
223. Kapp J. A., Araneo B. A., Clevinger B. L. Suppression of antibody and T cell proliferative responses to L-glutamic⁶⁰-L-alanine³⁰-L-tyrosine¹⁰ by a specific monoclonal T cell factor, *J. Exp. Med.*, **152**, 235 (1980).
224. Krupin K., Araneo B. A., Kapp J. A., Stein S., Wieder K. J., Webb D. R. Purification and characterization of a monoclonal T cell suppressor factor specific for poly(L-Glu⁶⁰-L-Ala³⁰-L-Tyr¹⁰), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1254 (1982).
225. Weider K. J., Araneo B. A., Kapp J. A., Webb D. R. Cell-free translation of a biologically active antigen-specific suppressor T cell factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3599 (1982).
226. Fresno M., Nabel G., McVay-Boudreau L., Furthmayer H., Cantor H. Antigen-specific T lymphocyte clones. I. Characterization of a T lymphocyte clone expressing antigen-specific activity, *J. Exp. Med.*, **153**, 1246 (1981).
227. Fresno M., McVay-Boudreau L., Nabel G., Cantor H. Antigen-specific T lymphocyte clones. II. Purification and biochemical characterization of an antigen-specific suppressive protein synthesized by cloned T cells, *J. Exp. Med.*, **153**, 1260 (1981).
228. Adorini L., Doria G., Ricciardi-Castagnoli P. Fine antigenic specificity and genetic restriction of lysozyme-specific suppressor T cell factor produced by radiation leukemia virus-transformed suppressor T cells, *Eur. J. Immunol.*, **12**, 719 (1982).
229. Bazevanis C. N., Ishii N., Nagy Z. A., Klein J. H-2 controlled suppression of T cell response to lactate dehydrogenase B. Characterization of the lactate dehydrogenase B suppressor pathway, *J. Exp. Med.*, **156**, 822 (1982).
230. Tada T., Okumura K., Miyatani S., Ochi A., Nakauchi H., Karasuyama H. Restricting elements in the immunological circuitry: Role of I region-controlled determinants, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (in press) (1983).
231. Eardley D. D., Hugenberger J., McVay-Boudreau L., Shen F. W., Gershon R. K., Cantor H. Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition, *J. Exp. Med.*, **147**, 1106 (1978).
232. Eardley D. D., Murphy D. B., Kemp J. D., Shen F. W., Cantor H., Gershon R. K. Ly-1 inducer and Ly-1,2 acceptor T cells in the feedback suppression circuit bear an I-J subregion controlled determinant, *Immunogenetics*, **11**, 549 (1980).
233. Tada T., Taniguchi M., Okumura K. Regulation of antibody response by antigen-specific T cell factors bearing I region determinants, *Prog. Immunol.*, **3**, 369 (1977).
234. Taniguchi M., Tokuhisa T. Cellular consequences in the suppression of antibody response by the antigen-specific T-cell factor, *J. Exp. Med.*, **151**, 517 (1980).
235. Tada T., Nonaka M., Okumura K., Taniguchi M., Tokuhisa T. Ia antigens on suppressor, amplifier and helper T cells. In: *Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function*, ed. by M. R. Quastel, p. 385, Academic Press, New York, 1979.
236. Germain R. N. Antigen-specific T cell suppressor factors: Mode of action, *Lymphokine Rep.*, **1**, 7 (1980).
237. Benacerraf B. Genetic control of the specificity of T lymphocytes and their regulatory products, *Prog. Immunol.*, **4**, 420 (1980).
238. Nisonoff A., Greene M. I. Regulation through idiotypic determinants of the immune response of the p-Azophenylarsonate hapten in strain A mice, *Prog. Immunol.*, **4**, 57 (1980).
239. Imanishi T., Makeda O. Strain differences in the fine specificity of mouse anti-hapten antibodies, *Eur. Immunol.*, **3**, 232 (1973).
240. Tada T., Suzuki G., Hiramatsu K. Some comments on the antigen receptors expressed on functional T cell hybridoma, *Lymphokine Rep.*, **5**, 119 (1982).
241. Weinberger J. Z., Germain R. N., Benacerraf B., Dorf M. E. Hapten-specific T-cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. V. Role of idiotypes in the suppressor pathway, *J. Exp. Med.*, **152**, 161 (1980).

-
242. Okuda K., Minami M., Sherr D. H., Dorf M. E. Hapten-specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. XI. Pseudogenetic restrictions of hybridoma suppressor factors, *J. Exp. Med.*, 154, 468 (1981).
243. Okuda K., Minami M., Furusawa S., Dorf M. E. Analysis of T cell hybridomas. II. Comparisons among three distinct types of monoclonal suppressor factors, *J. Exp. Med.*, 154, 1838 (1981).
244. Herzenberg L. A., Tokuhsa T., Herzenberg L. A. Carrier-priming leads to hapten-specific suppression, *Nature*, 285, 664 (1980).
245. Herzenberg L. A., Tokuhsa T., Parks D. R., Herzenberg L. A. Epitope-specific regulation. III. A bistable, Ig-restricted regulatory mechanisms central to immunologic memory, *J. Exp. Med.*, 155, 1741 (1981).
246. Swanborg R. H. Antigen-induced inhibition of experimental allergic encephalitis. III. Localizations of an inhibitory site distinct from the major encephalitogenic determinant of myeloma basic protein, *J. Immunol.*, 114, 191 (1975).
247. Turkin D., Sercarz E. E. Key antigenic determinants in regulation of the immune response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3984 (1977).
248. Adorini L., Miller A., Sercarz E. E. The fine specificity of regulatory T cells. I. Hen egg-white lysozyme-induced suppressor T cells in a genetically nonresponder mouse strain do not recognize a closely related immunogenic lysozyme, *J. Immunol.*, 122, 871 (1979).
249. Gershon R. K., Eardley D. D., Durum D. D., Shen F. W., Yamauchi K., Cantor H., Murphy D. B. Contrasuppression: A novel immunoregulatory activity, *J. Exp. Med.*, 153, 1533 (1981).

Регуляция образования антител различных классов

Джуди М. Тил, Норман Р. Клинман

(*Yudy M. Teale, Norman R. Klinman*)

19.1. Биологическая роль различных классов иммуноглобулинов

Отличительная черта гуморального иммунного ответа — это удивительная гетерогенность популяции молекул антител. Гетерогенность эта имеет двойную природу. Первый и наиболее важный вид — гетерогенность, связанная с участками узнавания антигена. Именно от нее зависит уникальная способность антител ориентироваться среди практически бесконечного множества потенциальных антигенных детерминант: она будет обозначена как репертуар антител. Второй, гораздо более ограниченный вид гетерогенности связан с экспрессией репертуара активных центров в комбинации с определенным типом константных участков тяжелой цепи. Этот процесс приводит к появлению различных классов, или изоформ Ig. Гетерогенность изоформ Ig, ее функциональное значение, клеточное и молекулярное происхождение являются увлекательной биологической загадкой, занимавшей умы ученых на протяжении нескольких последних десятилетий. Исследование этого явления привело к нескольким важнейшим открытиям в области регуляторных механизмов иммунной системы и молекулярных механизмов биологических систем в целом.

Гетерогенность молекул Ig впервые обнаружили Гейдельбергер и Педерсен [1], исследовавшие сывороточные Ig методом седиментационного анализа. Используя этот метод, они обнаружили, что кроме обычных Ig (7S) в сыворотке имеется еще популяция макроглобулинов (19S). О гетерогенности Ig свидетельствует и тот факт, что в воде часть Ig выпадала в осадок (эуглобулины), тогда как другая оставалась в растворе (псевдоглобулины). Хотя в свое время предполагали, что каждый из этих сывороточных иммуноглобулинов функционирует как отдельная биологическая система, появившаяся позднее «унифицирующая» гипотеза предсказала, что все Ig представляют собой незначительно различающиеся варианты одной и той же молекулы.

Применение современных иммунохимических методов в конце 50-х — начале 60-х годов позволило значительно уточнить это давнее предположение. К тому времени в отношении четырех видов — сначала для морской свинки [2], а затем для человека [3], мыши [4] и лошади [5] — было показано, что антитела, специфичные к одной и той же детерминанте, могут принадлежать к различным классам Ig. Несмотря на одинаковую специфичность, антитела, принадлежащие к разным классам Ig, различались по своим функциональным свойствам. Например, $\gamma 2$ -антитела морской свинки против ДНФ были способны связывать комплемент, а $\gamma 1$ -антитела против ДНФ были способны вызывать пассивную кожную анафилаксию. Более того, среди антител против бета-лактозида у одной и той же лошади IgG2-антитела были способны как к преципитации, так и к фиксации комплемента, в то время как IgGТ-антитела, связывающие ту же анти-

генную детерминанту с тем же сродством, не были способны ни к связыванию антигена (непреципитирующие антитела), ни к фиксации комплемента, хотя и могли угнетать эти процессы при смешивании с IgG2. На основе этих данных было высказано предположение, что иммунная система может выполнять различные функции путем синтеза антител с одинаковой специфичностью, но принадлежащих к разным изотипам с разными биологическими свойствами.

За последние 20 лет было проведено большое количество исследований, позволивших изучить спектр изотипов Ig у некоторых видов на физическом, химическом, а в ряде случаев и на структурном уровнях (см. гл. 7). Чтобы выполнить задачу, стоящую перед настоящей главой, мы сосредоточимся в основном на изотипах мыши, так как работы на клеточном и генетическом уровнях достигли наибольшего успеха при использовании именно этого объекта.

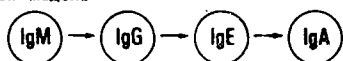
Как сказано в гл. 7, существуют восемь генетически и структурно идентифицированных классов и подклассов Ig, выделяемых в соответствии с изотипом тяжелой цепи: IgM, IgG, IgG3, IgG1, IgG2_a, IgG2_b, IgE и IgA. Первоначально эти классы и подклассы были идентифицированы по различиям в их антигенных свойствах; в настоящее время обнаружены небольшие или значительные различия в последовательности аминокислот, а также выяснено, что они кодируются разными участками хромосомы мыши, несущей locus тяжелой цепи. Очевидная функциональная специализация антител, принадлежащих к этим изотипам, кажется достаточной причиной для существования большого количества изотипов. Например, IgM — обычный примордиальный иммуноглобулин; он появляется первым при развитии плода и клетки. IgM обладает широкими функциональными возможностями. Это первый иммуноглобулин, появляющийся при иммунном ответе и при многих вариантах иммунного ответа — единственный. Его приспособленность к роли антитела значительно увеличивается вследствие его полимеризационной структуры и множественности участков, связывающих антиген. Кроме того, он весьма эффективен в связывании комплемента и агглютинации антигенов. Наиболее важное значение имеет тот факт, что одна из молекулярных форм IgM служит основным пусковым рецептором для подавляющего большинства первичных В-клеток. IgD обнаруживается в основном в виде поверхностных рецепторов и, кроме того, играет, вероятно, определенную роль и при активации первичных В-клеток. IgG может служить рецептором вторичных В-клеток, а в качестве сывороточного антитела крови обеспечивать фиксацию комплемента; в особенности это относится к IgG2. Следует отметить, что IgG2 способны проходить через плацентарный барьер и служат главным средством защиты новорожденных до тех пор, пока они сами не приобретут иммунокомпетенцию. IgA не в состоянии эффективно связывать комплемент, но могут выступать в роли поверхностных рецепторов. Поскольку IgA способны проникать сквозь слизистую оболочку, они играют значительную роль в защитных механизмах легких, кишечника и синовиальной жидкости. Важное значение имеет тот факт, что IgA в больших количествах содержатся в секретах молочных желез и передаются новорожденным с молоком, выполняя защитную функцию в период постнатального развития. IgE обладают способностью к фиксации тканями, в частности тучными клетками, о чем свидетельствуют их определяющая роль при немедленной гиперчувствительности и их предположительная роль при воспалении. Путем модуляции экспрессии Ig разных классов в различных тканях при многочисленных заболеваниях иммунная система, по-видимому, приобрела способность обеспечивать эффективную защиту как на уровне антител в сыворотке, так и на уровне защитных антител в тканях и секретируемых жидкостях.

Вероятно, наибольшая сложность, с которой сталкивается иммунная система, — это необходимость продуцировать и поддерживать необычайно разнообразный репертуар антител, способных распознавать все потенциально чужие антигены и в то же время селектированный таким образом, чтобы обеспечить отсутствие реакции на мириады собственных детерминант. Возможно, иммунная система решила проблему повышения эффективности использования своего тщательно отобранного репертуара антител, применяя его для выполнения множественных функций, что достигается путем создания вариабельного участка, состоящего из соответствующих вариабельных областей легкой и тяжелой цепей и соединенного с набором разных константных районов. Этот замечательный пример биологической экономии проявляется на клеточном уровне в том, что потомство каждого индивидуального предшественника может экспрессировать специфичный для клона уникальный вариабельный участок вместе с любым из множества изотипов, а на генетическом уровне — в сложной системе сплайсинга ДНК и РНК, а также в системе переключения (смотри гл. 8).

19.2. Предположения о моноклональном происхождении множественных изотипов

В настоящее время существуют две различные точки зрения на то, каким образом клетки начинают продуцировать определенный изотип (рис. 19.1). Одна из теорий (мультилинейная модель) предсказывает, что каждая индивидуальная В-клетка запрограммирована для образования определенного изотипа точно так же, как В-клетки запрограммированы на синтез определенного

Однолинейная модель



Мультилинейная модель

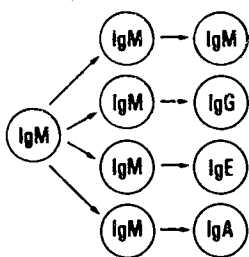


Рис. 19.1. Схематическое изображение двух возможных моделей, объясняющих запрограммированность В-клеток к данному изотипу.

Однолинейная модель: В-клетки и их потомство плюрипотентны по способности экспрессировать изотип. *Мультилинейная модель:* В-клетки монопотентны по способности экспрессировать изотип; изотипы при этом находятся под контролем множества клеточных линий, каждая из которых запрограммирована к определённому изотипу.

специфического вариабельного участка [6, 7]. В соответствии с этой моделью развитие В-клетки сопровождается ее коммитированностью к определённому классу без каких-либо внешних воздействий, таких, как стимуляция антигеном или Т-В-взаимодействия. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что у некоторых видов развитие плода и новорожденного сопровождается последовательной экспрессией клеток, несущих на своей поверхности IgM, IgG и IgA и продуцирующих эти изотипы при стимуляции митогенами. Тем не менее в популяции зрелых В-клеток доминируют клетки, несущие IgM или IgM в сочетании с IgD, и менее 1—3% клеток экспрессируют любые другие изотипы Ig.

Противоположная точка зрения (однолинейная модель) состоит в том, что, несмотря на существование некоторых клеток, несущих изотипы, отличные от IgM или IgD, предназначенных для образования данного изотипа или изотипов, подавляющее большинство В-клеток плюрипотентно в плане способности их клонального потомства синтезировать различные изотипы. Таким образом, хотя каждая конкретная В-клетка и ее клональное потомство монопотентны относительно специфичности своего вариабельного участка (клонотипа), ограничений, касающихся потенциала изотипов, практически не существует, особенно у зрелых В-клеток. В ранних работах, лежащих в основе этой теории, были обнаружены миеломные белки, имеющие одинаковый вариабельный участок, но экспрессирующие его на двух различных изотипах тяжелых цепей [8]. Кроме того, в ряде исследований было показано, что изредка удается обнаружить индивидуальные бляшкообразующие клетки (БОК), способные экспрессировать антитела более чем одного изотипа [9]. Наиболее показательные эксперименты осуществлялись *in vitro*, с использованием метода селезеночных колоний (фокальных узелков) [10]. Этот метод позволяет анализировать антитела, синтезируемые клональным потомством отдельной изолированной, стимулированной антигеном В-клетки в культуре фрагментов селезенки. Такие культуры получают путем переноса лимитирующего количества В-клеток летально облученному реципиенту, примированному носителем. Примирование реципиента обеспечивает максимальную помощь Т-клеток при ответе донорских В-клеток. Через день селезенку реципиента удаляют и разрезают на кусочки в 1 мм, которые затем инкубируют в присутствии антигена. Поскольку число перенесенных донорских клеток подбирается таким образом, что каждый фрагмент или содержит только одну В-клетку, реагирующую на данный антиген, или совсем не содержит таких клеток, тест является клональным. Ответы, полученные этим способом, не только моноклональны по происхождению, но и обеспечивают максимальное количество антител, продуцируемых каждым клоном, и максимальную способность экспрессировать все изотипы Ig.

Эксперименты, проведенные с помощью этого метода, показали, что одна В-клетка при стимуляции антигеном в присутствии хелперных Т-клеток может дать потомство, синтезирующее антитела по крайней мере трех изотипов, обладающих каждый идентичным идиотипом вариабельного участка [11]. С помощью аналогичных опытов эти закономерности были распространены на некоторые другие антигенные системы. Очевидно, во многих случаях подавляющее большинство первичных В-клеток способно при стимуляции антигеном давать начало дочерним клеткам, которые будут продуцировать антитела как минимум двух изотипов, а возможно, и 6—7 [12]. Впоследствии было показано, что клонированные линии гибридом также в состоянии переключаться с одного изотипа на другой при сохранении одного и того же вариабельного участка [13].

Хотя для всех систем обнаружена некоторая связь между способностью синтезировать множество изотипов и стадией развития данной В-клетки, тот факт, что почти все зрелые В-клетки плюрипотентны в отношении образования изотипов, имеет крайне важные последствия. Если большинство В-клеток способно производить любое количество разных изотипов, тогда доминирование одного из них при ответе на данный антиген (например, при ответе В-клеток в различных физиологических условиях) должно определяться либо непосредственно в момент антигенной стимуляции, либо при последующих регуляторных событиях. Таким образом, экспрессия изотипа в меньшей степени зависит от того, какая из В-клеток простимулировалась, а в большей степени — от того, каким образом это произошло, и (или) от того, как регулируется ее последующая клональная пролиферация и экспрессия Ig. Как будет показано в даль-

нейших разделах, эта регуляция может быть высокоспецифичной и либо положительной, приводящей к усилению экспрессии данного изотипа, либо отрицательной, состоящей в ее подавлении.

19.3. Генетические аспекты

Учитывая те преимущества, которые дает экспрессия тонко приспособленного репертуара переменных участков на Ig множественных изотипов, не приходится удивляться наличию высокоспециализированных механизмов, призванных обеспечить так называемый процесс переключения классов. Механизмы переключения классов на генетическом уровне быстро проявляются (см. гл. 8). У мышей, на которых проведено большинство экспериментов, имеется восемь C_H -областей или изотипов. Порядок генов, кодирующих эти области, следующий: $5' - C_{\mu}, C_{\delta}, C_{\gamma 3}, C_{\gamma 1}, C_{\gamma 2b}, C_{\gamma 2a}, C_{\epsilon}, C_{\alpha} = 3'$. Как отмечалось раньше, одна В-клетка может дать клональное потомство, продуцирующее несколько изотипов, которые будут иметь один и тот же идиотип и являться производными одного и того же гаплотипа тяжелой цепи [14]. Исходя из рассмотренных данных, можно предположить, что ген, кодирующий переменный участок тяжелой цепи, может последовательно соединяться с различными генами константных участков тяжелых цепей в пределах каждой отдельной линии В-клеток. При этом C_H -переключение происходит только в одной родительской хромосоме. Хондзо и Катаока [15], используя миеломы мыши, впервые показали, что переключение классов сопровождается делецией генов, расположенных с $5'$ -стороны от экспрессируемого гена C_H . Так, в миеломе, секретирующей IgG1, были делетированы гены C_{μ}, C_{δ} и $C_{\gamma 3}$. Впоследствии появилось несколько работ по миеломам и гибриdomам, подтвердивших делецию генов C_H в процессе переключения классов. Следовательно, однажды переключившись на определенный изотип, клетка больше не может переключиться на изотип, расположенный с $5'$ -стороны от экспрессируемого изотипа.

Предложены две молекулярные теории для объяснения делеции генов C_H при переключении с IgM на какой-либо другой изотип (см. гл. 8). В соответствии с первой гипотезой переключение может осуществляться следующим путем. Участок ДНК между геном V_H и экспрессируемым геном C_H выпячивается, образуя петлю, которая затем вырезается. Вторая теория предполагает негомологичную рекомбинацию в локусе гена C_H между сестринскими хроматидами при митозе. В этом случае в одной из дочерних клеток гены C_H будут дуплицированы, в другой — делетированы. Интересно, что в соответствии с моделью, предполагающей обмен между сестринскими хроматидами, гены C_H в дочерней клетке, содержащей дуплицированные гены C_H , могут быть рекомбинированы в порядке, отличном от такового в клетках зародышевого пути (гаметах).

Поразительным исключением из механизмов, связанных с делецией генов, является одновременная экспрессия IgM и IgD на мембране зрелых В-клеток. По-видимому, это происходит в результате дифференциального сплайсинга одного транскрипта мРНК, несущего гены V_H, C_{μ} и C_{δ} [16]. Кроме того, это может являться общим механизмом экспрессии других мембранных изотипов, поскольку для некоторых изотипов обнаружены экзоны, кодирующие мембранные белки. Установлено также, что у мыши и человека на поверхности лимфоцитов имеется даже по три разных изотипа (см. гл. 10).

Регуляция образования антител различных классов представляет собой в настоящее время противоречивый и волнующий вопрос клеточной иммуно-

логии. На генетическом уровне переключение классов и моноклональное происхождение множественных изотипов изучено достаточно четко. Следующая глава будет посвящена биологическим сигналам, которые могут индуцировать или влиять на образование изотипов при иммунном ответе.

19.4. Субпопуляции В-клеток и экспрессия изотипов

19.4.1. Образование изотипов в зависимости от степени зрелости В-клеток

Учитывая все вышеизложенное, нетрудно представить, что два важнейших фактора, определяющих изотип антител при данном ответе, это: а) изотипный потенциал стимулированных В-клеток и б) природа антигена и регуляторные механизмы, вовлеченные в стимуляцию этих В-клеток. Стадии развития и линейные маркеры В-лимфоцитов рассматриваются в гл. 3. С точки зрения экспрессии изотипа должна существовать прямая связь между изотипным потенциалом и фазой развития данной популяции В-клеток. С этой точки зрения В-клетки удобно разделить на три группы: а) незрелые В-клетки, доминирующие в популяции В-клеток у плода и новорожденного, — на их долю приходится 25 % предшественников антителообразующих клеток в костном мозге и менее 5 % — в селезенке взрослой мыши; б) зрелые В-клетки, доминирующие в популяциях В-клеток всех лимфоидных органов взрослой мыши, и в) вторичные В-клетки, появляющиеся в результате стимуляции антигеном. Как сказано выше, подавляющее большинство зрелых первичных В-клеток несут IgM или IgM + IgD в качестве поверхностных рецепторов. Такие В-клетки при стимуляции в соответствующих условиях дают начало клонам, продуцирующим антитела нескольких, если не всех классов. Таким образом, преобладание в ответе этих В-клеток одного из классов Ig может объясняться способом антигенной стимуляции, действием регуляторных факторов или же величиной стимула, разрешающего транскрибировать гены константных участков в различной степени.

Вслед за стадией пре-В-клеток, но до наступления полной зрелости, В-клетки проходят через стадию развития, в течение которой они бывают восприимчивы к антигенной или митогенной стимуляции, но при этом не способны, видимо, давать клоны, плюрипотентные в плане экспрессии изотипов. Такие незрелые В-клетки при стимуляции в культуре фрагментов могут образовать IgM и (или) IgA, но не могут продуцировать ни один из подклассов IgG [12]. Хотя приобретение клетками способности синтезировать IgM на очень ранних стадиях развития не вызывает удивления, кажется парадоксальным, что они могут продуцировать IgA, кодируемый самым дистальным локусом тяжелой цепи, раньше, чем все другие классы Ig. Тем не менее неспособность таких клеток давать IgG-ответ говорит о связи по крайней мере некоторых аспектов экспрессии и переключения изотипов со стадией развития В-клеток. Очень интересно, что В-клетки не в состоянии синтезировать IgG в тот период своего развития, когда они наиболее подвержены индукции толерантности [17] (см. гл. 20). Имеется ли связь между приобретением способности синтезировать IgG и возникновением устойчивости к индукции толерантности, пока еще неизвестно. Стимуляция соответствующим антигеном, особенно при наличии помощи со стороны Т-клеток, приводит не только к появлению клеток, продуцирующих антитела, но и к образованию новых популяций предшественников, которые по ряду признаков можно отнести ко вторичным В-клеткам [10] (см. гл. 3).

Вторичные В-клетки, как и незрелые В-клетки, могут обладать более ограниченным изотипным потенциалом, чем подавляющее большинство первичных В-клеток [12]. Например, в то время как некоторые вторичные В-клетки экспрессируют поверхностные IgM и, несомненно, могут давать начало клонам, продуцирующим антитела любого изотипа, остальные, очевидно, потеряли способность к образованию IgM или других изотипов. Любопытно, что изотипный потенциал вторичных клеток может быть связан с изотипом их мембранных рецепторов; этому вопросу посвящен следующий раздел данной главы.

19.4.2. Связь образования изотипов с экспрессией поверхностных Ig

С увеличением количества данных, подтверждающих гетерогенность В-клеток, становится очевидным, что разделение пула В-клеток на субпопуляции поможет изучить потенциальную способность В-клеток к синтезу различных классов Ig. Один из подходов, примененный несколькими исследователями, сводится к разделению В-клеток в зависимости от изотипа поверхностных Ig (s-Ig, pIg). Результаты работ с использованием положительной и отрицательной селекции достоверно показали, что экспрессирующие s-IgM или s-IgD непротестированные В-клетки, составляющие большинство В-клеточного пула, дают в системе адоптивного переноса IgM-ответ, за которым следует IgG-ответ. С другой стороны, s-IgG⁺-клетки давали в первую очередь IgG-ответ (см. обзор [18]).

Поскольку в приведенных исследованиях использовали систему адоптивного переноса, а не клонированные В-клетки, трудно было учесть роль таких факторов, как регуляция активации В-клеток *in vivo* (отрицательная обратная связь у клеток s-IgG⁺ и s-IgM⁺ или различная способность к пролиферации у разных подгрупп В-клеток). Поэтому, а также для того, чтобы выявить все минорные популяции клеток (что очень важно, так как на долю клеток, четко коммитированных к какому-либо изотипу, приходится 5% В-клеточного пула), аналогичные эксперименты были проведены с использованием фрагментов селезенки для получения клонов, секретирующих антитела [12]. Полученные результаты

Таблица 19.1. Соотношение клонов из подгрупп В-клеток, секретирующих определенные изотипы ¹⁾ (по [12])

Подгруппа В-клеток	Прибли- зительный ответ от общего, %	% клонов, секретирующих						
		IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgE	IgA
Первичные В-клетки								
Нефракционированные	100	41	6	53	18	4	0	88
s-μ ⁺	88,7	31	8	69	23	8	0	77
s-μ ⁻	11,3	69	8	8	8	0	0	77
В-клетки памяти								
Нефракционированные	100	33	24	96	41	33	22	63
s-μ ⁺	56,7	25	3	88	16	38	3	38
s-μ ⁻ γ ⁻	12,5	50	0	50	0	0	0	50
s-μ ⁻ γ ⁺	30,5	4	4	83	13	30	17	48

¹⁾ Клоны, полученные из различных фракционированных субпопуляций клеток селезенки, были проанализированы на наличие изотипа(ов) с помощью соответствующей сыворотки против тяжелых цепей.

говорят о том, что почти 90% от общего клонального ответа первичных В-клеток может быть отнесено за счет В-клеток $s-\mu^+$ (табл. 19.1). 60% этих стимулированных антигеном клеток $s-\mu^+$ дают клоны, секретирующие один или более подклассов Ig. Более чем основная часть первичных В-клеток секретирует более одного изотипа, причем значительная их часть — 3, 4, 5 различных изотипов (табл. 19.2). Эти данные подтверждают то, что образование IgG —

Таблица 19.2. Количество изотипов, секретируемых клонами из подгрупп В-клеток (по [12])

Подгруппа В-клеток	% индивидуальных клонов, секретирующих следующие количества различных изотипов						
	1	2	3	4	5	6	7
Первичные В-клетки							
Нефракционированные	35	29	31	6	0	0	0
$s-\mu^+$	18	29	24	18	12	0	0
$s-\mu^-$	54	39	0	8	0	0	0
В-клетки памяти							
Нефракционированные	20	24	20	15	11	9	2
$s-\mu^+$	44	28	13	13	3	0	0
$s-\mu^- \gamma^-$	50	50	0	0	0	0	0
$s-\mu^- \gamma^+$	48	26	13	9	0	4,3	0

процесс, управляемый антигеном, а не запрограммированный в онтогенезе. Кроме того, эти данные свидетельствуют в пользу однолинейной модели экспрессии изотипов, поскольку единственная В-клетка может давать несколько изотипов, в том числе IgG и IgA, при последовательной пролиферации и дифференцировке. Об этом свидетельствует наличие относительно редко встречающейся легкой λ -цепи у каждого из тех нескольких клонов, которые были способны секретировать четыре или более изотипов. Это практически исключает всякое сомнение в том, что они являются истинными клонами. Аналогичные опыты независимо провели Джизрхарт и Цебра [19], которые использовали один и тот же тест с клонированием В-клеток, но разные системы антигенов — фосфорилхолин (ФХ) и динитрофенил (ДНФ) — и разные источники В-клеток (пейеровы бляшки и селезенку). Они установили, что более половины клонов, полученных от положительных В-клеток $s-\mu^+$, секретируют IgG и большинство из них секретировало также IgM и IgA.

Связь между фенотипом рецептора и принадлежностью В-клеток памяти к определенному классу также до конца не выяснена. В ряде работ, проведенных в основном с использованием системы адоптивного переноса, было показано, что клеточную память почти целиком можно отнести за счет В-клеток s -IgG и что каждый IgG указывает на принадлежность клетки памяти и ее потомства к определенному классу и аллотипу. Другие исследователи продемонстрировали наличие В-клеток $s-\mu^+$, которые восстанавливают IgG-ответ при адоптивном переносе. Кроме того, Пресс и Климан [20] обнаружили наличие В-клеток, способных давать начало антиген-специфическим клонам, продуцирующим более одного изотипа.

И в этом случае аналогичные работы проводились двумя независимыми группами. Они использовали сортировщик флуоресцирующих активированных клеток (FACS, ФАКС) для выделения подгруппы В-клеток, несущих определен-

ный изотип, наряду с культивированием фрагментов селезенки для получения в дальнейшем антитело-секретирующих клонов. Тил и др. [12] показали, что чуть больше половины ответа вторичных клонов составляет продукт клеток $s-\mu^+$, большинство из которых давало начало IgG-секретирующим клонам [12] (табл. 19.1 и 19.2). Важно отметить, что подкласс клеток памяти $s-\mu-\gamma^+$, составляющий 30% от общего ответа, давал IgG-секретирующие клоны, но только в форме IgG ($\pm$ IgA), но не IgM и IgG. Очевидно, В-клетки, не экспрессирующие больше $s-\mu$, теряют способность секретировать IgM, сохраняя при этом способность к секреции изотипов, кодируемых генами, расположенными с 3'-конца относительно гена C_H , включая изотипы IgE и IgA. Точно такие же результаты получили Джизерхарт и Цебра [19]. При использовании ФХ в качестве антигена большинство В-клеток s -IgG⁺ дают клоны, продуцирующие IgG, но не IgM. Из этого можно сделать вывод о необратимости переключения с $C_{H\mu}$ на другие изотипы C_H , что согласуется с делеционной моделью экспрессии Ig.

Противоречивые результаты были получены и в ряде работ, посвященных изучению В-клеток памяти, экспрессирующих на поверхности IgD. В экспериментах с применением клеточного сортировщика для разделения клеток наблюдалось сохранение иммунологической памяти s -IgD⁺ и s -IgD⁻-субпопуляциями клеток памяти после адоптивного переноса в облученного хозяина. Сразу после стимуляции содержание В-клеток этих двух подклассов примерно одинаково, но со временем равновесие смещается в сторону клеток s -IgD⁻. В системе адоптивного переноса подгруппа В-клеток s -IgD⁻ восстанавливает значительно более avidный ответ [21]. Предположению о созревании В-клеток s -IgD⁻ в высокоавидные клетки противоречит ряд экспериментальных данных о персистенции s -IgD⁺-В-клеток памяти у примированных животных; при этом в ответах этих двух субпопуляций практически не наблюдалось никакой разницы [22].

Выделенные по отдельности s -IgD⁺- и s -IgD⁻-субпопуляции В-клеток памяти были исследованы в системе клонированных В-клеток. Оказалось, что обе подгруппы вносят значительный вклад в появление клеток иммунологической памяти, но подгруппа s -IgD⁻ была сильно обогащена В-клетками памяти в расчете на одну В-клетку. Кроме того, обе подгруппы были способны давать клоны, секретирующие множественные изотипы, в том числе IgM. Отчетливо показано, что никаких различий в распределении изотипов между клонами субпопуляций s -IgD⁺ и s -IgD⁻ не выявляется [23].

19.4.3. Связь образования изотипов с не-Ig-маркерами клеточной поверхности

Хотя связь между экспрессией изотипов и степенью зрелости или поверхностным изотипом В-клеток относительно ясна, вопрос о том, каким образом экспрессия изотипов связана с предположительно размножающимися линиями В-клеток, остается открытым. Несколько лет назад была обнаружена небольшая субпопуляция В-клеток, лишенных Ia. Такие клетки были способны продуцировать IgM, но не IgG (возможность синтеза IgA не проверялась) [24]. Видимо, это относительно незрелые клетки селезенки или костного мозга, что соответствует их экспрессируемому изотипическому потенциалу.

Вероятно, существуют линии В-клеток, способные отвечать на Т-независимые (Т-I), но не на Т-зависимые (Т-D) антигены. Действительно, лишь варьирующее число В-клеток несет рецепторы к данным митогенам (см. гл. 3). Как будет описано ниже, стимуляция Т-I в первую очередь приводит к IgM-ответу. Из-за этого создается впечатление, что Т-I-В-клетки способны продуцировать только IgM. Но, возможно, чувствительность к определенным митогенам свя-

зана не только с существованием различных клеток линий, но и со степенью зрелости В-клеток [25]. Более того, так называемые Т-I- и Т-D-популяции В-клеток могут значительно перекрываться. В результате при стимуляции антигеном Т-D одна и та же В-клетка способна синтезировать множество изотипов антител. Безусловно, взаимосвязь между линиями В-клеток, отвечающими на антигены Т-I и Т-D, нуждается в дальнейшем изучении.

Наиболее удобной экспериментальной моделью для выявления отдельных линий В-клеток служат мыши СВА/N. В данном случае мутантная линия мышей СВА/N или самцы, принадлежащие к **потомству** гибридов F_1 этой линии, характеризуются отсутствием субпопуляции В-клеток, несущих серию таких поверхностных маркеров, как Lyb3, Lyb5, Lyb7 и IAW39 [25, 26]. Поскольку мыши дефектных линий продуцируют относительно небольшие количества IgM и IgG3, можно считать: те линии В-клеток, которые имеются у этих мышей, относительно рестриктированы по способности к синтезу разных изотипов [27]. В настоящее время пока еще неясно, где именно проявляется эта изотипическая недостаточность — на уровне В-клеток или же на уровне каких-то имеющих у этих мышей нарушений, способных оказывать влияние на стимуляцию и регуляцию В-клеток.

19.5. Кинетика появления изотипов при иммунном ответе: зависимость от порядка расположения генов *Ig*

Помимо степени зрелости В-клеток, принимающих участие в иммунном ответе, уровень экспрессии изотипов, возможно, определяется отчасти конфигурацией генов, кодирующих различные изотипы, внутри локуса генов тяжелых цепей. Ген $C_{H\mu}$ расположен на 5'-конце локуса генов тяжелых цепей и, как было давно обнаружено, первым изотипом, выявляющимся при иммунном ответе, является IgM. Действительно, изучение влияния анти-IgM на образование изотипов, а также на появление классов Ig в процессе онтогенеза и кинетику их появления после стимуляции антигеном показало, что IgM играют центральную роль в механизме переключения тяжелых цепей и все IgG- и IgA-продуцирующие клетки развиваются из IgM-секретирующих клеток [25]. Аналогичные данные позволили предположить, что IgG-продуцирующие клетки — предшественники IgA-синтезирующих клеток, хотя в многочисленных опытах было показано, что последовательные превращения $IgM \rightarrow IgG \rightarrow IgA$ необязательны и что клетки, секретирующие IgA, могут возникать из IgM-предшественников независимо. Однако помимо того, что при иммунном ответе IgM появляются первыми, у нас мало оснований предполагать последовательное, заранее запрограммированное появление остальных изотипов. Пасанен и др. [28] при детальном анализе кинетики иммунного ответа на пневмококковый полисахарид типа III наблюдал появление на 3-й день секретирующих IgM бляшкообразующих клеток (БОК). На 4-й и 5-й день они секретируют одновременно IgM и либо IgG1, IgG2, либо IgA. На 7-й день большинство БОК секретировали лишь один из указанных классов антител. Аналогичным образом, используя тринитрофенил-фикол в качестве антигена для стимуляции бестимусных мышей, лишенных Т-клеток, Монжини и др. [29] не обнаружили дифференцированного появления каких бы то ни было подклассов IgG. Однако они отметили, что при внесении в экспериментальную систему Т-клеток максимальные титры IgG1, IgG2_a, IgG2_b и IgG3 наблюдались на несколько дней раньше, чем в контроле, в отсутствие Т-клеток. На основании этих данных

Монжини и др. высказали предположение о том, что Т-клетки могут, по-видимому, каким-то образом влиять на скорость дифференцировки в IgG-продукты.

Опыты с использованием TD-клонировующих методов показали, что значительная часть антителопродуцирующих клонов секретирует множество изотипов. Интерпретация данных о кинетике появления различных изотипов внутри клона привела к тем же результатам: не было различий в появлении изотипов IgG, IgA или IgE. Конечно, эти данные не согласуются с моделью последовательного переключения с одной тяжелой цепи на другую в соответствии с порядком расположения генов в ДНК. Напротив, они более соответствуют такому механизму, при котором одна дочерняя клетка клона секретирует один класс Ig, в то время как другая может переключиться на синтез совершенно другого класса Ig [14, 30]. Однако, поскольку переключение генов C_H в направлении 5'-конца менее вероятно, в ходе иммунного ответа будет наблюдаться тенденция к появлению изотипов, кодируемых генами, расположенными в направлении 3'-конца.

Ингибирование цитокинеза приводит к увеличению количества как двухъядерных клеток, так и клеток, содержащих два изотипа. Отсюда напрашивается вывод, что процесс переключения тяжелых цепей происходит одновременно с делением клетки [31]. Более того, поскольку часть генов C_H , по-видимому, теряется при переключении классов (по крайней мере у трансформированных клеточных линий), можно заключить, что процесс переключения классов в направлении от гена 5'- C_H к гену 3'- C_H необратим [15]. Большинство экспериментов, связанных с переключением классов, согласуются с гипотезой о переключении тяжелых цепей от 5'-конца к 3'-концу. Между тем Радбрух и др. [32] сообщили о том, что в одном из вариантов миеломы X63 переключение происходит в противоположном направлении — от $C_{H\gamma 2b}$ к $C_{H\gamma 1}$. Более того, у стимулированных антигеном В-клеток обнаружено переключение $\text{IgA} \rightarrow \text{IgG}$ [30]. Это очень интересное наблюдение в свете данных, полученных при изучении миеломы линии MC101, у которой переключение, видимо, происходит в направлении $C_\mu \rightarrow C_\alpha \rightarrow C_{\gamma 1}$ [33]. Переключение классов тяжелых цепей в направлении от 3' - к 5'-концу трудно объяснить с помощью рассмотренной выше делеционной модели, предусматривающей образование ДНК-петли. Однако оно хорошо вписывается в модель обмена сестринскими хроматидами при экспрессии Ig. Следует отметить, что число рекомбинаций, необходимых для переключения от 3'-конца к 5'-концу, согласно второй модели, больше, чем это необходимо для переключения в обратном направлении, и соответственно клонов с переключением от 5'-конца к 3'-концу должно быть больше, чем клонов, у которых переключение идет в противоположном направлении.

19.6. Роль независимой и зависимой от Т-клеток антигенной стимуляции в регуляции экспрессии изотипов

Подавляющее большинство первичных В-клеток несет IgM и (или) IgD, причем потомство этих клеток обладает практически неограниченной способностью к экспрессии изотипов при стимуляции антигеном. Поэтому основным фактором, определяющим экспрессию изотипов при первичном иммунном ответе, являются способ антигенной стимуляции или регуляторные процессы. Для удобства все иммуногены подразделяют на две группы: Т-независимые (Т-I) и Т-зависимые (Т-D). С помощью разнообразных экспериментальных подходов

(см. гл. 12) антигены Т-I были охарактеризованы как антигены, способные вызывать иммунный ответ в отсутствие антиген-специфических Т-клеток. Эти антигены в свою очередь были подразделены на два класса в соответствии с их способностью стимулировать В-клетки дефектных мышей линии СВА/Н и появлением в процессе онтогенеза чувствительных к антигену В-клеток. Так, Т-независимые антигены 1-го класса (ТИ-1) могут в отличие от Т-независимых антигенов 2-го класса (ТИ-2) стимулировать В-клетки дефектных мышей линии СВА/Н. Кроме этого, у нормальных мышей способность отвечать на антигены ТИ-1 появляется раньше, чем способность отвечать на антигены ТИ-2. К антигенам Т-D относят все антигены, способные активировать В-клетки только в присутствии антиген-специфических Т-клеток. В зависимости от того, каким из двух антигенов (Т-D или Т-I) были стимулированы В-клетки, изотипы, продуцируемые потомством стимулированных В-клеток, будет различными.

19.6.1. Т-независимая стимуляция

В ранних работах было установлено, что антигены Т-I вызывают главным образом IgM-ответы и лишь незначительный IgG-ответ (либо вообще не вызывают IgG-ответа). Вдобавок они оказались слабыми индукторами клеточной памяти. Однако позднее были описаны антигены Т-I, индуцирующие синтез IgG, так же как и клеточную память. Поскольку при инкубации В-клеток с антигенами Т-I, действующими как поликлональные активаторы В-клеток (ПВА), индуцируется до 1/3 клеток селезенки, этот метод очень удобен для определения способности В-клеток к переключению изотипов. Из всех ПВА наиболее подробно изучены липополисахариды (ЛПС); исследовано также действие митогенов фитолакки (PWM), *Corynebacterium parvum* и *Brucella abortus*. В этих исследованиях большинство активированных ЛПС IgM-секретирующих клонов переключалось на синтез IgG или IgA, причем предпочтение оказывалось IgG3 и IgG2 [34]. Сходные результаты были получены для В-клеток из различных тканей. Поскольку число клеток, секретирующих различные изотипы, одинаково у нормальных и бестимусных мышей, было высказано предположение, что наблюдаемая частота секретирующих клеток не зависит от Т-клеток, однако это утверждение остается спорным (см. ниже). Авторы проводят параллель между относительной частотой переключения определенного C_H , а именно $IgG3 > IgG2 > IgG1 > IgA$, и порядком генов C_H в ДНК ($\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ и α). Возможно, у В-клеток, чувствительных к ЛПС, способность к переключению пропорционально уменьшается в направлении от 5'- к 3'-концу хромосомы. В дальнейшем было высказано предположение о том, что несоответствие (если учитывать порядок расположения генов C_H) между низким содержанием IgG1 по сравнению с IgG2 вызвано либо изначальной коммитированностью В-клеток экспрессировать определенные гены C_H , либо селективными регуляторными сигналами, поддерживающими клональную экспансию. Последнему предположению отдается предпочтение, так как в более ранних работах было показано, что ЛПС-активированные клетки, дающие в норме высокий IgG3- и низкий IgG1-ответ, в присутствии специфичных Т-хелперных сигналов могут быть индуцированы к высокому IgG1- и низкому IgG3-ответу [35].

Это последнее наблюдение имеет большое значение, поскольку в ряде других работ, выполненных сравнительно недавно, было установлено, что зависимость от Т-клеток — это вопрос степени и что некоторые из Т-клеточных факторов могут влиять на те ответы, которые раньше считались полностью независимыми от Т-клеток. Наиболее важные данные о регуляции классов получили Монжини и др. [29]; эти авторы изучали влияние Т-клеток на образование под-

класса IgG в ответ на такие антигены TI-2, как ТНФ-фикол и ТНФ-леван. Изучение влияния Т-клеток на очевидный Т-I-ответ имело тот смысл, что при этом открывалась возможность обнаружить действие изотип-специфических регуляторных Т-клеток, которое при Т-D-ответе может маскироваться Т-клетками, специфичными к носителю. В отсутствие Т-клеток распределение и количество классов Ig, появившихся в ответ на ТНФ, шло в следующем порядке: $IgM > IgG3 > IgG1 > IgG2_b > IgG2_a$. Такой порядок соответствует расположению генов тяжелых цепей. Как и при изучении описанного выше действия ЛПС, было сделано предположение, что в отсутствие Т-клеточной регуляции количество антител, принадлежащих к различным классам и синтезируемых после стимуляции, контролируется порядком расположения генов Ig. При переносе сингенных непримированных Т-клеток в экспериментальную систему они способствовали увеличению количества IgG2-антител, особенно IgG2_a. Объяснить это можно двумя путями: 1) Т-клетки, специфичные к IgG2_a, могут активировать уже коммитированные В-клетки, несущие на поверхности IgG2_a; 2) Т-клетки способны обеспечить дополнительные активирующие сигналы, под действием которых в В-клетках повышается количество переключений тяжелых цепей — процесс, приводящий к переключению на более отдаленные гены константных участков. Но поскольку в этих работах Т-клетки не были предварительно стимулированы антигеном, трудно объяснить появление специфических Т-клеток, обеспечивающих такие сигналы.

На важную роль Т-клеток при распределении классов Ig в процессе стимуляции антигеном Т-I указывают также Мак-Кеарн и др. [36], обнаружившие, что у бестимусных мышей IgG1- и IgG2-ответы на липосахариды и митогены фитоллаки были значительно ниже, чем в контроле. IgG3-ответ, очевидно, менее всего зависит от Т-клеток; частота ответов у бестимусных мышей составляла приблизительно лишь 55—65% от частоты ответов у контрольных мышей. Это наблюдение хорошо согласуется с многочисленными экспериментальными данными о том, что антигены Т-I, как правило, вызывают значительный IgG3-ответ, в то время как под действием антигенов Т-D индуцируется довольно слабый IgG3-ответ. Как уже говорилось выше, количество и распределение изотипов в опытах с использованием таких антигенов Т-I, как ЛПС, ТНФ-фикол и ТНФ-леван, генетически контролируется порядком расположения генов тяжелой цепи. Однако правомерность такого вывода нельзя считать абсолютной, поскольку стимуляция такими антигенами Т-I, как PWM и *C. parvum* (поликлональные активаторы), приводит к другой иерархии классов иммуноглобулинов: $IgG1 > IgG3 > IgG2_b > IgG2_a$. Таким образом, даже в случае стимуляции антигеном Т-I в регуляции переключения классов должны участвовать определенные биологические сигналы, которые предстоит детально исследовать. В настоящее время ясно, что нет четкого представления о том, вызваны ли различия в действии разных антигенов Т-I какими-то неизвестными свойствами Т-клеток или нет.

19.6.2. Т-зависимые ответы

Одной из наиболее интересных сторон этого вопроса является роль Т-хелперных клеток в качестве стимулятора синтеза множественных классов Ig при гуморальном иммунном ответе. Среди первых антигенов Т-D, используемых для подтверждения факта образования множественных изотипов, были гетерологичные эритроциты. Пирс и др. [37], используя систему *in vitro*, показали, что как примированные, так и непримированные В-клетки в ответ на бараньи эритроциты продуцируют IgM, IgG1, IgG2 и IgA.

Роль Т-клеток в образовании классов Ig, отличных от IgM, была выявлена в ряде работ, проведенных на тимэктомированных мышах с пониженным содержанием Т-клеток. У этих мышей в ответ на антигены Т-D образовывалось почти нормальное количество IgM, но очень мало IgG. Однако введение им нормальных Т-клеток частично восстанавливало IgG-ответ [38]. Предположение об аналогичной функции Т-клеток при синтезе IgG вытекает из экспериментов с мутантными бестимусными мышами, для которых характерно нормальное содержание IgM и очень низкое (1% от контроля) содержание IgG1. Кроме того, такие мыши не способны синтезировать значительные количества IgG в ответ на введение антигенов [39]. Имеются также данные о зависимости IgA- и IgE-ответов от Т-клеток. Было высказано предположение, что субпопуляции Т-клеток, усиливающие ответы IgA и IgE, отличаются от Т-клеток, увеличивающих продукцию других классов и подклассов Ig [40, 41].

Одно из наиболее ярких доказательств участия Т-клеток в переключении классов тяжелых цепей было получено в опытах с клонированием В-клеток с последующим сравнением изотипов, продуцируемых первичными В-клетками при стимуляции сингенными и аллогенными Т-клетками, примированными носителями [42]. Ранее было показано, что индивидуальные гаптен-специфические первичные В-клетки, стимулированные в присутствии избытка сингенных Т-клеток, специфичных к носителю, в культуре фрагментов селезенки дают начало IgM- и IgG-продуцирующим клонам. Однако после стимуляции первичных В-клеток в присутствии аллогенных Т-клеток наблюдалось примерно такое же количество гаптен-специфических клонов, но ни один из них не продуцировал IgG. Таким образом, в зависимости от сигнала Т-клетки одни и те же В-клетки могут превращаться или не превращаться в IgG-секретирующие клоны.

Эксперименты, проведенные недавно на иммунодефицитных мышах CBA/N, также указывают, что образование классов Ig регулируется Т-клетками. В предыдущих опытах с использованием линии мышей CBA/N была, как описано выше, обнаружена избирательная недостаточность при IgG3-ответе независимо от того, каким антигеном (Т-I или Т-D) проводилась стимуляция [36]. Поскольку мутация X^{id} у мышей CBA/N является плеiotропной, представлялось интересным выяснить, можно ли объяснить недостаток IgG3 у этих мышей только дефицитом В-клеток. Действительно, было показано, что, хотя Т-клетки иммунодефицитных мышей были нормальными по способности отвечать на митогены, по хелперной активности при гуморальных ответах и цитотоксичности, они оказались дефектными в том смысле, что были не способны к неспецифическому усилению поликлонального ответа на ЛПС [25].

Чтобы полнее понять природу дефицита IgG3 у мышей линии CBA/N и возможную роль Т-клеток, В-клетки дефектных самцов F_1 (CBA/N $\times$ BALB/c) тестировали с помощью метода селезеночных колоний. При этом в качестве реципиента использовали либо дефектных самцов F_1 (CBA/N $\times$ BALB/c), либо нормальных самок F_1 (CBA/N $\times$ BALB/c) [43]. Таким образом, В-клетки стимулировались в присутствии Т-клеток и макрофагов нормальных (самки) и дефектных (самцы) мышей. Клетки нормальных гибридных самок F_1 (CBA/N $\times$ BALB/c) проверялись с теми же комбинациями реципиентов (контроль). Из результатов, приведенных в табл. 19.3, следует, что неспособность дефектных мышей продуцировать анти-ДНФ-секретирующие клоны, синтезирующие IgG3, связана с их Т-, а не В-клетками. Таким образом, в популяции Т-клеток дефектных мышей либо совсем отсутствует подкласс Т-клеток, ответственных за переключение на IgG3, либо Т-клетки этих мышей каким-то образом выведены из обращения. В любом случае, поскольку большинство проанализированных клонов, синтезирующих IgG3, содержат также другие изотипы, регу-

Таблица 19.3. Роль Т-клеток при недостатке IgG3 у дефектных самцов мышей CBA/N × BALB/c

Группа Т-клеток ¹	Проанализированных ДНФ-специфичных клонов	% Клонов, секретирующих IgG3
♀ → ♀	27	11,1
♂ → ♂	41	0
♀ → ♂	73	1,4
♂ → ♀	41	14,6

¹ Нестимулированные клетки селезенки, полученные от гибридных самок или самцов F₁ (CBA/N × BALB/c), обрабатывали антителами против Thy 1.2 и комплементом, а затем переносили в организм летально облученных реципиентов, примированных гемоцианином фиссурелли (KHL). Затем готовили культуры фрагментов и стимулировали их ДНФ-KHL. В полученных впоследствии клонах, секретирующих анти-ДНФ, определяли анти-ДНФ IgG3.

ляторные процессы, действующие при клональной экспансии, должны быть в какой-то степени избирательны в отношении IgG3. Такие эксперименты показали, что отнюдь не различная изотипическая предрасположенность В-клеток лежит в основе механизма экспрессии изотипов, по крайней мере для Т-зависимых ответов. Эти данные служат веским доводом в пользу утверждения, что образование изотипов регулируется Т-клетками.

Вопрос о том, одна или более Т-клеток требуется для переключения изотипов Ig, остается спорным. Использование современных методов клонирования Т-клеток показало, что В-клетки можно индуцировать к пролиферации и дифференцировке в IgM-секретирующие клетки в присутствии одного клона Т-клеток [44]. Менее ясно, нужны ли Т-клетки второго типа для появления других изотипов Ig. Пирс и др. [45] пришли к выводу, что индивидуальная антиген-специфическая Т-клетка способна осуществлять хелперные функции для экспрессии множественных классов Ig. Этот вывод был сделан на основании экспериментов с культурой фрагментов, где Т-клетки подвергались лимитирующему разведению в присутствии избытка В-клеток. Более того, в последующих опытах с использованием той же экспериментальной системы были получены результаты, позволившие предположить, что индивидуальная специфичная к носителю Т-клетка может стимулировать по меньшей мере две В-клетки, специфичные к двум различным антигенным детерминантам [46]. Были, однако, опубликованы и другие работы, показавшие, что субпопуляции Т-клеток обеспечивают образование лишь одного изотипа антител при иммунном ответе. Как отмечено выше, имеются данные о хелперной функции, специфичной для IgA и IgE [40, 41].

19.7. Позитивная и негативная регуляция экспрессии изотипов Т-клетками

Большое число экспериментов указывает на существование Т-клеток, узнающих детерминанты Ig, в том числе изотипические, аллотипические и идиотипические детерминанты. Остается неясным, играют ли подобные Т-клетки главную роль при индукции дифференцировки, например стимулируя переключение изотипов, либо их функции ограничиваются избирательным усилением или ослаблением экспрессии В-клеток, которые уже дифференцированы и экспрессируют на своей поверхности антитела определенного изотипа или идиотипа.

Если бы изотип-специфичные Т-клетки существовали, было бы сравнительно просто представить механизм их действия при отборе В-клеток, несущих поверхностные антитела определенного изотипа. Однако подавляющее большинство В-клеток экспрессирует на своей поверхности IgM или IgM и (или) IgD еще до того, как произойдет стимуляция антигеном. Следовательно, IgG- или IgA-специфичные хелперные Т-клетки должны, по-видимому, действовать на В-клетки, уже активированные антигеном. Еще более важное значение имеет соблюдение следующего условия: чтобы на В-клетку действовала изотип-специфическая Т-клетка, необходимо, чтобы на В-клетке экспрессировались s-IgG и s-IgA, т. е. в ней уже должно произойти переключение классов. В свете этих данных предположение о том, что Т-клетки, специфичные к классам Ig, необходимы для самого процесса переключения классов, кажется парадоксальным.

Этот видимый парадокс может указывать на действие Т-клеток, узнающих детерминанты Ig на поздних сроках. Конечно, на ранних стадиях большинство иммунных ответов гетерогенно как в отношении классов Ig, так и в отношении их идиотипов. Если существование таких ограничивающих Т-клеток имеет физиологическое значение, то вполне возможно, что они обеспечивают усиление и приспособление последующих иммунных ответов, а не получение определенного изотипа или идиотипа. В большинстве работ по изучению иммунных ответов при участии рестриктирующих Т-клеток использовали вторичные В-клетки. Вероятно, первичные В-клетки стимулируются без всякого ограничения и в процессе развития клона могут стимулировать соответствующую группу Т-клеток, узнающих детерминанты рецепторов клеточной поверхности. Эти Т-клетки способны оказывать значительное влияние на последующую стимуляцию вторичных В-клеток.

Первое доказательство важного вклада Т-клеток в специфическую регуляцию экспрессии изотипов Ig было получено в ранних опытах, показавших, что при определенных условиях аллотип потомства гибрида F_1 может меняться. Эту так называемую аллотипическую супрессию впервые обнаружили у кроликов; у них материнские антитела частично подавляли аллотип отца [47]. В эксперименте такая супрессия может быть вызвана как у кроликов, так и у мышей. Показано, что супрессия поддерживается длительное время и зависит от Т-клеток. Более поздние опыты выявили, что аллотипическая супрессия оказывает сильное влияние на вторичные ответы для одного изотипа, не влияя при этом на остальные изотипы [48].

Были проведены и другие эксперименты, в которых была выявлена возможная роль аллотип- или идиотип-специфических Т-клеток в усилении ответов. Большинство исследователей исходили из предположения о существовании по крайней мере двух популяций хелперных Т-клеток: одной — специфичной к носителю, но не рестриктированной изотипом, и второй — специфичной к изотипу или аллотипу. К примеру, Нутт и др. [49], используя конгенные по аллотипу линии СВА (IgHj и IgHb), получили данные о Т-клетках, узнающих детерминанты Ig. Они обнаружили, что Т-клетки, первично стимулированные в среде, не содержащей продуктов гена *IgHj*, были неэффективными хелперами при стимуляции В-клеток IgHj бараньими эритроцитами. Они обнаружили также сильное ослабление ответов в случае всех проанализированных изотипов. Исходя из этих данных, авторы предположили, что после стимуляции антигеном примированные антигеном В-клетки или их продукты активируют популяцию Т-клеток, которые в свою очередь способны оказывать избирательное влияние на В-клетки, содержащие соответствующие продукты гена *IgH*. Необходимо отметить, что во многих таких экспериментах не всегда возможно

провести различие между изотип-, аллотип- или идиотип-специфическими Т-клетками.

В гл. 22 подробно рассматривается роль спектра идиотипов при иммунном ответе. Очевидно, что идиотип-специфические Т-клетки в состоянии существенно усиливать или подавлять экспрессию В-клеток. Поскольку такое усиление или торможение может приводить к значительному изменению способности стимулированных антигеном В-клеток к пролиферации, Т-клетки, очевидно, также могут сильно влиять на изотип(ы), экспрессируемый впоследствии этими В-клетками.

Помимо того что в процессе иммунного ответа хелперные Т-клетки усиливают экспрессию всех изотипов, кроме IgM, они также увеличивают аффинитет антител. Так, ряд исследователей показали, что стимуляция В-клеток в отсутствие Т-клеток или при ограничении их количества дает антитела с относительно низким аффинитетом [10]. Напротив, «иммунологическое обучение», т. е. увеличение аффинитета антител с течением времени после иммунизации, в большой степени зависит от наличия Т-хелперов [50]. Двойственный эффект хелперных Т-клеток, проявляющийся как в усилении сдвига изотипов, так и в увеличении аффинитета антител, может, хотя бы частично, объяснить явно выраженное увеличение аффинитета IgG-антител, в противоположность IgM-антителам обнаруженное во многих лабораториях. Хотя и были выявлены IgM с высоким аффинитетом, тот факт, что IgG в общем обладают более высоким аффинитетом, позволил предположить, что переключение классов существенно для получения антител с высокой степенью родства [51]. Действительно, некоторые исследователи считают, что переключение классов имеет важное значение для увеличения разнообразия антител [52]. Поскольку потомство одной стимулированной В-клетки способно продуцировать как IgM, так и IgG с одинаковыми идиотипами и специфичностями, трудно представить, чтобы изменение специфичности или увеличение аффинитета было общим следствием переключения классов. С другой стороны, если переключение классов повышает разнообразие Ig, способность IgG проявлять высокую степень родства может иметь огромное значение для иммунных механизмов *per se*. Вопрос о том, почему IgG обладают более сильным аффинитетом, чем IgM, будет оставаться неясным до тех пор, пока не удастся разграничить функции Т-клеток в механизмах увеличения степени родства и усиления переключения классов.

19.8. Регуляторные механизмы, специфичные для классов

19.8.1. Роль микроокружения при экспрессии IgA

В ряде случаев было замечено, что введение антигена через слизистую дыхательных путей или желудочно-кишечный тракт приводит к более интенсивному образованию IgA, чем парентеральное введение антигена. Известно также, что лимфоидные фолликулы слизистой, такие, как пейеровы бляшки, обогащены предшественниками плазматических клеток, синтезирующих IgA. Таким образом, при использовании различных лимфоидных тканей для заселения клеток летально облученной мыши клетки из пейеровых бляшек заселяют стенки кишечника плазматическими клетками более эффективно, чем клетки из других лимфоидных тканей. Эти данные побудили Цебру и др. [53] выяснить, что именно в микроокружении лимфоидных фолликулов слизистой приводит к явной предпочтительности синтеза В-клетками IgA.

Чтобы получить на этот вопрос ответ, в той же лаборатории использовались фрагменты селезенки, в которых сравнивали частоту появления В-клеток, специфичных к специально введенному постороннему антигену, с частотой В-клеток специфичных к антигенам, постоянно присутствующим в кишечнике, например к некоторым бактериальным антигенам [53]. Из полученных результатов было очевидно, что иммунизация чужеродным антигеном, таким, как холерный токсин, приводила к существенному увеличению частоты антиген-специфических В-клеток в пейеровых бляшках. Однако после иммунизации антигеном ФХ, в норме присутствующим в кишечнике, такого эффекта не наблюдалось. Авторы пришли к выводу, что В-клетки, специфичные к антигенам микроокружения, уже прошли стадию клональной экспансии и, следовательно, являются вторичными В-клетками. Этот вывод подкрепляется данными о значительно более низкой частоте обнаружения В-клеток, специфичных к антигенам среды, у безмикробных животных [53].

Помимо этого они сравнили распределение изотипов, синтезируемых клональными потомками В-клеток, либо неиммунизированных, либо специально иммунизированных, либо иммунизированных естественным путем, и выявили существование определенных различий между этими группами. Еще более важное значение имеет тот факт, что при анализе В-клеток из пейеровых бляшек, специфичных к таким антигенам среды, как ФХ, преобладали клоны, секретирующие только IgA. Такой исключительно IgA-фенотип редко встречается в селезенке, а также в селезенке и пейеровых бляшках при использовании антигенов, отсутствующих в микроокружении, например, ДНФ (табл. 19.4). В ре-

Таблица 19.4. Сравнение изотипов, продуцируемых анти-ФХ- и анти-ДНФ-секретирующими клонами, полученными из селезенки или пейеровых бляшек неиммунизированной мыши (по [53])

Изотипы, экспрессируемые отдельными клонами	% антигаптенowych клонов, секретирующих различные комбинации изотипов			
	анти-ФХ		анти-ДНФ	
	селезенка	пейеровы бляшки	селезенка	пейеровы бляшки
Только IgM	9	3	20	16
Некоторое количество IgM	75	37	96	64
IgG±IgA, но не IgM	25	63	4	36
Некоторое количество IgA	69	65	53	62
Только IgA	4	40	1	11

зультате авторы пришли к выводу, что высокая частота возникновения В-клеток, чувствительных к антигенам, в норме присутствующим в кишечнике, и высокое относительное содержание таких клеток, обеспечивающих исключительную экспрессию IgA в пейеровых бляшках, связаны с постоянной стимуляцией антигенами микроокружения [53].

Цebra и др. [53] предложили молекулярную модель, в соответствии с которой микроокружение секреторной слизистой оболочки способствует антиген-зависимой клональной экспансии, в первую очередь в отсутствие дифференцировки плазматических клеток. Это приводит к рестрикции изотипов в соответствии с делеционной моделью экспрессии изотипов, предложенной Хондзо и Катаокой [15]. Таким образом, предполагается, что переключение классов зависит от клеточного деления и протекает необратимо, но необязательно ступенчато

в соответствии с порядком генов C_H , пока не дойдет до гена C_α . Следовательно, чем больше делений происходит в пределах В-клеточной линии или клонотипа, тем сильнее ограничивается потенциальная способность клональных потомков к экспрессии множественных изоформ. В результате клеточных делений в пейеровых бляшках накапливаются В-клетки, претерпевшие последнюю перестройку до гена C_α и, следовательно, способные синтезировать только IgA.

В данном случае уместно будет отметить частичную зависимость IgA-ответа от Т-клеток и резкое ослабление ответа в их отсутствие. Элсон и др. [41] сообщили, что популяция Т-клеток в пейеровых бляшках обладает более высокой хелперной активностью по отношению к IgA, чем Т-клетки селезенки и периферических лимфатических узлов. Поскольку в различных тканях имело место независимое изменение регуляторной активности Т-клеток в отношении IgA по сравнению с IgM и IgG, они отдали предпочтение предположению о IgA-специфических хелперных Т-клетках. На основании собственных данных и данных, полученных Цебра и др. [53], авторы высказали мнение, что антигены среды в лимфоидных фолликулах слизистой предпочтительно активируют IgA-специфичные хелперные Т-клетки, которые избирательно увеличивают пул В-клеток, синтезирующих IgA, и, возможно, пул клеток памяти.

19.8.2. Роль Fc-рецепторов при экспрессии IgE

Регуляция секреции IgE представляет большой интерес как с клинической, так и с экспериментальной точки зрения, так как она играет важную роль в патогенезе аллергических заболеваний. Хотя в сыворотке как здоровых, так и больных людей IgE обычно присутствуют в очень малых количествах, они могут оказывать сильное физиологическое действие. Так, всего лишь несколько молекул IgE способны сенсibilизировать тучные клетки и базофилы. Последующее введение антигена приводит к высвобождению сильнодействующих медиаторов, например вазоактивных аминов. Следовательно, механизмы, контролирующие синтез IgE, должны быть ориентированы на сведение к минимуму образования этого изоформы. Действительно, на ранних этапах исследования было показано, что способы иммунизации, обычно приводящие к появлению IgG, не вызывали у подопытных животных синтеза IgE. Более того, индуцированный иммунный ответ IgE часто носил кратковременный характер [54—56].

Одна из наиболее важных ролей IgE-системы — это ее бесспорное участие в механизмах защиты организма хозяина от паразитов, проникающих в организм через желудочно-кишечный тракт или кожу. Много лет назад было обнаружено, что заражение такими гельминтами, как *Nippostrongylus brasiliensis*, приводит к образованию большого количества IgE, не оказывая практически никакого влияния на содержание IgG. Любопытно, что большая часть IgE, синтезированных в этих условиях, не специфична в отношении паразита, как будто сам паразит оказывает поликлональное адъювантподобное действие, особенно на синтез IgE. Хотя механизм, с помощью которого антитела, специфичные к паразиту, помогают защищать организм хозяина, в точности не известен, отчасти его можно объяснить способностью антител связываться с макрофагами, которые в свою очередь могут прикрепляться к паразитам и убивать их [54, 60].

Поскольку во многих ранних исследованиях, посвященных IgE-ответу, отмечалось существование различий в регуляции IgE по сравнению с регуляцией других изоформ, было проведено тщательное изучение системы IgE в плане IgE-специфических регуляторных механизмов. Хотя IgE, подобно другим классам Ig, находится под контролем антиген-специфических хелперных и супрессорных Т-клеток, IgE-ответ регулируется также и с помощью меха-

низмов, избирательных для IgE, таких, как неспецифические супрессорные механизмы [54—56]. Тада [57], используя в качестве экспериментальной модели крыс, показал, что ряд таких воздействий, как радиоактивное облучение всего тела, удаление тимуса у взрослых особей или введение иммуносупрессивных препаратов, приводил к тому, что после иммунизации наблюдалось увеличение уровня и стабилизации синтеза IgE вместо обычного временного образования IgE-антител. Тот факт, что усиленный IgE-ответ мог быть снижен путем пассивного переноса сингенных тимоцитов, подтверждает существование супрессорного Т-клеточного механизма, в норме снижающего IgE-ответ, Кац [55] проводил аналогичные наблюдения над мышами и установил, что усиление IgE-ответов после облучения происходит вследствие истощения неспецифичных супрессорных Т-клеток. Более того, Букли и др. [58] сообщили о существовании IgE-супрессорных Т-клеток у человека и о пониженной регуляторной способности таких клеток у аллергических пациентов. Таким образом, полученные данные указывают на то, что IgE-ответ подвержен как антиген-, так и изотип-специфической регуляции.

Чтобы объяснить ограниченность IgE-ответа, а также существование контрольных механизмов, избирательных в отношении IgE, ранее было высказано предположение относительно регуляции синтеза IgE отдельной субпопуляцией В-клеток, предназначенных только для синтеза IgE. Однако, когда ответ IgE

Таблица 19.5. Сочетание изотипов, продуцируемых IgE-секретирующими клонами (по [59])

Источник донорских клеток	Число проанализированных клонов, секретирующих IgE	% клонов, секретирующих изотипы в следующих комбинациях ¹				
		только ε	ε+μ	ε+α	ε+γ ²	ε ≥ двух других изотипов
Первичные В-клетки						
Селезенка	24	0	4,1	0	8,3	87,5
В-клетки памяти						
Селезенка	31	0	0	0	16,1	83,8
Брыжеечный лимфатический узел	10	0	0	0	0	100

¹ Клоны, секретирующие анти-ДНФ-IgE, исследовали с помощью РИА на наличие других изотипов. При этом использовали следующие антитела к тяжелым цепям: анти-IgM, анти-IgG1, анти-IgG2a, анти-IgG2b, анти-IgG3 и анти-IgA.

² Эта группа включает в себя клоны, секретирующие IgE в сочетании с любым из подклассов IgG.

был изучен с помощью клонирования В-клеток, обнаружили, что подавляющее большинство стимулированных антигеном IgE-продуцирующих клонов секретирует еще по крайней мере два других изотипа [59] (табл. 19.5). Следовательно, клональные предшественники продуцентов IgE способны экспрессировать множество классов Ig и отнюдь не коммитированы исключительно к синтезу IgE. Отсюда следует вывод, что механизмы, избирательно контролирующие образование IgE, разрешают или предотвращают его синтез, не оказывая при этом влияния на синтез других изотипов.

Поиски механизмов, приводящих к избирательной регуляции IgE, способствовали разработке множества методик для опытов *in vitro* и открытию ряда

растворимых факторов, которые, видимо, избирательно подавляют или усиливают IgE-ответ, но не специфичны по отношению к антигену. Поскольку описание всех этих исследований выходит за рамки данной главы и поскольку недавно было опубликовано несколько подробных обзоров на эту тему [54—56, 60], мы рассмотрим в качестве примера лишь несколько работ, выполненных совсем недавно.

Как отмечалось выше, заражение нематодами *N. brasiliensis* приводит к повышенному образованию IgE, почти не влияя на синтез IgG. Эти данные побудили Ишизака и др. [60] проверить, способны ли факторы, выделенные из лимфоцитов зараженных крыс, усилить образование IgG *in vitro* [55]. В результате были описаны два биологически активных фактора, названные IgE-генерирующим и IgE-усиливающим факторами В-клеток. Первый фактор выделяли из супернатанта культуры клеток брыжеечного лимфатического узла, взятого у зараженных крыс. Оказалось, что он способен стимулировать развитие клеток, несущих IgE, в культурах нормальных клеток брыжеечного лимфатического узла и клеток костного мозга. IgE-генерирующий фактор, по-видимому, секретируется s-IgM, s-IgD и s-IgE В-клетками; его образование усиливается при добавлении антител против IgD или против IgE, но не антител против IgM. Синтезированный фактор индуцирует незрелые клетки, синтезирующие только IgM, к дифференцировке в IgM- и IgE-экспрессирующие клетки. Следовательно, В-клетки, уже переключившиеся на определенный изотип, способны продуцировать факторы, переключающие другие В-клетки на этот же изотип. Точный механизм этого процесса пока неизвестен.

Напротив, IgE-усиливающий фактор активизирует IgE-содержащие клетки или плазматические клетки. В результате добавления этого фактора к культурам, стимулированным антигеном, активировались клетки, содержащие IgE, но не IgG [60]. Дальнейшие опыты позволили предположить, что мишенью IgE-усиливающего фактора являются В-клетки. В пользу этого предположения говорила адсорбция фактора фракцией клеток, обогащенной В-клетками, а не Т-клетками. Наконец, было выявлено сродство (аффинитет) этого фактора к IgE. Возможно, именно способностью связывать IgE объясняется тот факт, что второй фактор избирательно увеличивает IgE-ответ, не оказывая влияние на IgG-ответ. Впоследствии Ишизака и др. [60] предположили, что фактор связывается с В-клеткой — предшественником IgE-синтезирующих клеток через поверхностные IgE — и таким образом усиливает их дифференцировку в IgE-плазматические клетки. В свете вышеизложенного о роли изотип-специфических Т-клеток необходимо отметить, что в этих опытах использовались вторичные В-клетки, среди которых были, вероятно, и IgE-несущие клетки.

Предположение относительно источника IgE-усиливающего фактора возникло в результате отдельной серии экспериментов. Было обнаружено, что брыжеечные лимфатические узлы крыс, зараженных *N. brasiliensis*, содержат повышенное количество клеток, несущих рецепторы для детерминант, расположенных на Fc-фрагментах молекул IgE (FcR_{ξ}^+). К этому времени было известно, что макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы содержат рецепторы для Fc. Лимфоциты с Fc-рецепторами (FcR), в частности Т-лимфоциты, вызывают особый интерес в связи с выявлением функциональных различий в зависимости от конкретного фенотипа FcR. Так, среди Т-клеток человека был выявлен подкласс несущих FcR Т-клеток, специфичных к IgM (FcR_{μ}) и к IgG (FcR_{γ}). Эти подклассы соответствуют хелперным и супрессорным Т-клеткам соответственно. Шпигелберг [61] был первым, кто обнаружил лимфоциты FcR_{ξ}^+ и показал, что большинство из них являются В-клетками. Однако Т-клетки FcR^+ обнаружены у больных аллергией, а это предполагает их участие в процессах, связанных

с повышенным синтезом IgE. Данная гипотеза согласуется с данными о том, что после заражения крыс или мышей *N. brasiliensis* у них повышается содержание IgE, а также увеличивается количество $FcR\frac{1}{2}$ Т-клеток.

Поскольку доля Т-клеток $FcR\frac{1}{2}$ возрастает только при наличии высокого уровня синтеза IgE (например, при паразитарных инвазиях, аллергиях), была проверена и в дальнейшем обнаружена способность таких клеток секретировать растворимые факторы [60]. Растворимый фактор, выделенный из Т-клеток $FcR\frac{1}{2}$, но не из В-клеток, подавлял образование розеток $FcR\frac{1}{2}$ -клеток с эритроцитами быка, покрытыми IgE. Следовательно, этот фактор способен связывать IgE. При дальнейшем изучении IgE-связывающего фактора было выявлено сильное сходство между ним и упомянутым выше IgE-усиливающим фактором. Возможно, это один и тот же фактор. В пользу такого предположения говорит тот факт, что супернатанты культур $FcR\frac{1}{2}$ не содержали ни IgE-связывающего, ни IgE-усиливающего факторов. Более того, может быть, фактор, секретируемый Т-клетками $FcR\frac{1}{2}$, и есть FcR. Фридман и др. [62] обнаружили аналогичные IgE-связывающие факторы, полученные из Т-клеток, экспрессирующих поверхностные FcR. Авторы также высказывали мнение, что Ig-связывающий фактор, обладающий в этом случае супрессорной активностью, и есть FcR.

В параллельных опытах с использованием зараженных паразитами крыс были описаны растворимые медиаторы, обладающие супрессорной активностью, избирательной для IgE-ответов. Фактор, супрессирующий IgE, и фактор, усиливающий синтез IgE, отличаются по содержанию углеводов в молекуле, но оба они связывают IgE. На основании этих данных Ишизака и др. [60] высказали мнение, что такие неспецифичные к антигену IgE-связывающие растворимые медиаторы с противоположным действием отвечают за избирательную регуляцию IgE-ответа.

В пользу этого высказывания свидетельствуют работы Каца и др. [55, 56], в которых описываются аналогичные антиген-неспецифические растворимые медиаторы, усиливающие и подавляющие IgE-ответ. Такие медиаторы в варьирующих количествах были обнаружены у нормальных мышей [55, 56]. Следует отметить, что эти два фактора, названные «фактор, усиливающий аллергию» (ФУА, EFA) и «фактор, подавляющий аллергию» (ФПА, SFA), не были способны связывать IgE в отличие от растворимых медиаторов, обнаруженных при заражении паразитами. Отсюда вытекает, что механизм действия этих факторов в норме и при заражении паразитами различен, а их мишенью необязательно должна служить В-клетка, несущая IgE. Поскольку биологическое действие EFA и SFA можно наблюдать *in vivo*, при пассивном переносе факторов, Кац и сотр. предположили, что способность продуцировать IgE в ответ на введение антигена определяется соотношением EFA:SFA у данной особи. Более того, эти исследователи, используя периферические лимфоциты крови, стимулированные антигеном вместе с митогеном, не так давно обнаружили аналог SFA у человека [56].

Были найдены и другие растворимые медиаторы, обладающие усиливающим или подавляющим действием; их синтез индуцировался различными способами. Кроме того, Ватанабе и др. [63] описали гибридому, способную непрерывно продуцировать IgE-супрессирующий фактор. Сравнение всех этих факторов позволило выявить ряд различий в видовой специфичности, а также в физико-химических и иммунологических свойствах (например, МНС-рестрикция и связывание IgM). Между тем все изученные факторы были одинаково неспецифичны к антигену, даже если для их образования требовалась специфическая стимуляция антигеном. Другое объединяющее их свойство — это присущая им всем способность действовать только на синтез IgE, не влияя, по-видимому, на

Ig остальных классов. Точный механизм действия этих факторов требует дальнейших исследований. Тем не менее изучение растворимых медиаторов, принимающих участие в регуляции синтеза IgE, многие из которых продуцируются Т-клетками, подтверждает значение регуляторных механизмов, определяющих выбор синтезируемого изотипа.

Заключение

Как видно из предыдущих разделов, способность иммунной системы экспрессировать множество классов Ig представляет собой замечательный пример приспособления биологических систем к выполнению необходимых функций. Использование соответствующих молекулярных и регуляторных механизмов позволяет экспрессировать генетический материал с максимальной эффективностью. Хотя многие аспекты экспрессии изотипов, включая степень запрограммированности отдельных В-клеток, а также специфичность и влияние потенциальных регуляторных механизмов, до конца не выяснены, появилось несколько общих направлений, которые охватывают большую часть этого важного явления.

Множество своих функций гуморальная иммунная система осуществляет при максимальном использовании разнообразного, но специфичного репертуара переменных участков. Отдельный репертуар переменных участков экспрессируется в сочетании с разнообразным набором константных участков, каждый из которых обладает разными биологическими возможностями. На молекулярном уровне это достигается путем рекомбинаций и сплайсинга, а на клеточном уровне — существованием огромного количества В-клеток, монопотентных в отношении экспрессии переменных участков и плюрипотентных в плане экспрессии изотипов Ig, содержащих этот переменный участок. Изотип каждого ответа в основном будет определяться регуляторными механизмами, включающимися в процессе стимуляции антигеном специфичных к нему В-клеток и, в меньшей степени, изотипическим потенциалом стимулированных В-клеток.

При первичном ответе подавляющее большинство В-клеток, за исключением небольшого количества незрелых либо запрограммированных к определенному изотипу зрелых В-клеток, плюрипотентно относительно последующей экспрессии изотипа их клональными потомками. Следовательно, изотипы, экспрессируемые при первичном иммунном ответе, будут в большой степени зависеть от природы иммуногена, например Т-I или Т-D, и от природы регуляторных механизмов, таких, как присутствие определенного набора Т-клеток при стимуляции антигеном. Нами были представлены данные, отражающие современную точку зрения на последствия стимуляции различными антигенами — в присутствии или в отсутствие разных субпопуляций Т-клеток.

Поскольку вторичные В-клетки в большей степени запрограммированы к определенному классу, изотип-специфические регуляторные механизмы должны оказывать на них сильное влияние. Несмотря на то что основная часть вторичных клеток, способных к неограниченной экспрессии изотипов, несет IgM, очевидно, значительное количество вторичных В-клеток несет IgG, IgA или IgE вместо IgM, при этом они обладают более ограниченным изотипным потенциалом. Благодаря фенотипу своих поверхностных рецепторов такие ограниченные В-клетки скорее всего являются клетками-мишенями для избирательной стимуляции изотип-специфическими Т-клетками. При исследовании экспрессии изотипов очень важным, но малоизученным остается вопрос о том, какой фактор отвечает за возникновение вторичных В-клеток. На протяжении всей главы

обсуждались механизмы, направляющие иммунные ответы на образование определенных изотипов, таких, как IgA и IgE.

С появлением новых данных относительно точных молекулярных механизмов, принимающих участие в переключении изотипов, а также степени влияния В- и Т-клеток на переключение классов, можно ожидать, что многие из рассматриваемых выше вопросов будут разрешены. Можно также предположить, что наше понимание механизмов, управляющих экспрессией изотипов, будет углубляться по мере накопления новых сведений о поверхностных рецепторах В-клеток и факторах, взаимодействующих с этими рецепторами. Что касается регуляции IgE-ответа, которая обсуждалась детально, то она в конечном счете сможет служить образцом при изучении многих изотип-специфических регуляторных явлений.

Благодарность

Эта работа частично субсидировалась из фондов (AI 15797) национальных институтов здоровья. Авторы благодарят Carol Wood за неоценимую техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Heidelberger M., Pedersen K. O.* The molecular weight of antibodies, *J. Exp. Med.*, **65**, 393—414 (1973).
2. *Ovary Z., Benacerraf B., Block K. J.* Properties of guinea pig 7S antibodies. II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis, *J. Exp. Med.*, **117**, 951—964 (1963).
3. *Mannik M., Kunkel H. G.* Two major types of normal 7S gamma globulin, *J. Exp. Med.*, **117**, 213—230 (1963).
4. *Fahey J. L., Wunderlich J., Mishell R.* The immunoglobulins of mice I. Four major classes of immunoglobulins, 7S γ 2,—7S γ 1,— γ 1a—(β _{2a})— and 18S γ 1m-globulins, *J. Exp. Med.*, **120**, 223—242 (1964).
5. *Klinman N. R., Rockey J. G., Karush F.* Valence and affinity of equine nonprecipitating antibody to a haptenic group, *Science*, **146**, 401—403 (1964).
6. *Cooper M. D., Lawton A. R., Kincade P. W.* A two stage model for development of antibody producing cells, *Clin. Exp. Immunol.*, **11**, 143—149 (1972).
7. *Abney E. R., Cooper M. D., Kearney J. R., Lawton A. R., Parkhouse R. M. E.* Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: A systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity, *J. Immunol.*, **120**, 2041—2049 (1978).
8. *Wang A., Wilson S., Hopper J., Fundenberg H., Nisonoff A.* Evidence for control of synthesis of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 337—343 (1970).
9. *Nossal G., Warner N., Lewis H.* Incidence of cells simultaneously secreting IgM and IgG antibody to sheep erythrocytes, *Cell. Immunol.*, **2**, 41—53 (1971).
10. *Klinman N. R.* The mechanisms of antigenic stimulation of primary and secondary clonal precursor cells, *J. Exp. Med.*, **136**, 241—260 (1972).
11. *Gearhart P. J., Sigal N. H., Klinman N. R.* Production of antibodies of identical idio type but diverse immunoglobulin classes by cells derived from a single stimulated B cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1707—1711 (1975).
12. *Teale J. M., Lafrenz D., Klinman N. R., Strober S.* Immunoglobulin class commitment exhibited by B lymphocytes separated according to surface isotype, *J. Immunol.*, **126**, 1952—1957 (1981).
13. *Baumhacker H., Liefsegang B., Radbruch A., Rajewsky K., Sablitzky F.* Switch from NP-specific IgG3 to IgG1 in the mouse hybridoma cell line S24/63/63, *J. Immunol.*, **128**, 1217—1220 (1982).
14. *Gearhart P. J., Hurwitz J. L., Cebra J. J.* Successive switching of antibody isotypes expressed within the lines of a B cell clone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5424—5428 (1980).
15. *Honjo T., Kataoka T.* Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2140—2144 (1978).
16. *Moore K. W., Rogers J., Hunkapillar T., Early P., Nottenberg C., Weissman I., Bazin H., Wall R., Hood L. E.* Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1800—1805 (1981).

17. Metcalf E. S., Klinman N. R. In vitro tolerance induction of neonatal and adult bone marrow cells. A functional marker for B cell maturation, *J. Immunol.*, 118, 2111—2116 (1977).
18. Lafrenz D., Strober S., Teale J., Klinman N. R. Relationship between surface immunoglobulin isotypes and secreted isotypes during B cell differentiation. In: *Proceedings of the Second International Conference on B lymphocytes in the Immune Response*, ed. by N. R. Klinman E. Mosier. I. Scher, E. Vitetta, pp. 377—383. Elsevier/North Holland, New York, 1981.
19. Gearhart P. J., Cebra J. J. Most B cells that have switched surface immunoglobulin isotypes generate clones of cells that do not secrete IgM, *J. Immunol.*, 127, 1030—1034 (1981).
20. Press J. L., Klinman N. R. Monoclonal production of both IgM and IgG1 anti-hapten antibody, *J. Exp. Med.*, 135, 300—305 (1973).
21. Herzenberg L. A., Black S. J., Tokuhisa T., Herzenberg L. A. Memory B cells as successive stages of differentiation: Affinity maturation and the role of IgD receptors, *J. Exp. Med.*, 151, 1071—1087 (1980).
22. Lafrenz D., Strober S., Vitetta E. The relationship between surface immunoglobulin isotype and immune function of murine B lymphocytes, *J. Immunol.*, 127, 867—872 (1981).
23. Lafrenz D., Teale J. M., Strober S. Role of IgD in immunological memory, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 399, 375—386 (1982).
24. Press J. L., Klinman N. R., McDevitt H. O. The expression of Ia antigens on B cell subpopulations, *J. Exp. Med.*, 144, 414—427 (1976).
25. Kincade P. W. Formation of B lymphocytes in fetal and adult life, *Adv. Immunol.*, 31, 177—245 (1981).
26. Ahmed A., Smith A. H., Kessler S. W., Scher I. Ontogeny of Murine B cell surface antigens and functions. In: *Animal Models of Comparative and Developmental Aspects of Immunity and Disease*, ed. by M. C. Geshwing and E. L. Cooper, pp. 1—24, Pergamon Press New York, 1978.
27. Slack J., Der-Balian G. P., Nahm M., Davie J. M. Subclass restriction of murine antibodies. II. The IgG plaque-forming cell response to thymus-independent type 1 and type 2 antigens in normal mice and mice expressing an X-linked immunodeficiency, *J. Exp. Med.*, 152, 853—862 (1980).
28. Pasanen V. J., Asofsky R., Baker P. J. Synthesis of two classes of antibody, γ M and γ G or γ M and γ A, by identical cells, *J. Exp. Med.*, 149, 1227—1237 (1979).
29. Mongini P. K. A., Stein K. E., Paul W. E. T cell regulation of IgG subclass antibody production in response to T-independent antigens, *J. Exp. Med.*, 153, 1—12 (1981).
30. Teale J. M. The potential of B lymphocytes for isotype expression, *Fed. Proc.*, 41, 5—9 (1982).
31. Van der Loo W., Gronowicz E. S., Strober S., Herzenberg L. A. Cell differentiation in the presence of cytochalasin B: Studies on the «switch» to IgG secretion after polyclonal B cell activation, *J. Immunol.*, 122, 1203—1208 (1979).
32. Radbruch A. B., Liesegang B., Rajewsky K. Isolation of variants of mouse myeloma X63 that express changed immunoglobulin class, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2909—2913 (1980).
33. Davis M. M., Wim S. K., Hood L. E. DNA sequences mediating class switching in alpha immunoglobulin genes, *Science*, 209, 1360—1365 (1980).
34. Benner R., Coutinho A., Rijnbeek A.-M., van Oudenaren A., Hooijkaas H. Immunoglobulin isotype expression. II. Frequency analysis in mitogen-reactive B cells, *Eur. J. Immunol.*, 11, 799—804 (1981).
35. Martinez-Alonso C., Coutinho A., Augustin A. Immunoglobulin C-gene expression. I. The commitment to IgG subclass of secretory cells is determined by the quality of the non-specific stimuli, *Eur. J. Immunol.*, 10, 698—702 (1980).
36. McKearn J. P., Pasley J. W., Slack J., Baum C., Davie J. M. B cell subsets and differentiation responses to mitogens, *Immunol. Rev.*, 64, 5-23 (1982).
37. Pierce C. W., Solliday S. M., Asofsky R. Immune responses in vitro, *J. Exp. Med.*, 135, 698—710 (1972).
38. Davie J. M., Paul W. E. Role of T lymphocytes in the humoral response. I. Proliferation of B lymphocytes in thymus-deprived mice, *J. Immunol.*, 113, 1438—1445 (1974).
39. Braun D. G., Kindred B., Jacobson E. B. Streptococcal group A carbohydrate antibodies in mice: Evidence for strain differences in magnitude and restriction of the response, and for thymus dependence, *Eur. J. Immunol.*, 2, 138—143 (1972).
40. Kimoto M., Kishimoto T., Noguchi S., Watanabe T., Yamamura Y. Regulation of antibody response in different immunoglobulin classes. II. Induction of in vitro IgE antibody response in murine spleen cells and demonstration of a possible involvement of distinct T helper cells in IgE and IgG antibody responses, *J. Immunol.*, 118, 840—845 (1977).
41. Elson C. O., Heck J. A., Strober W. T cell regulation of murine IgA synthesis, *J. Exp. Med.*, 149, 632—643 (1979).

42. *Pierce S. K., Klinman N. R.* The allogenic bisection of carrier specific enhancement of monoclonal B cell responses, *J. Exp. Med.*, **142**, 1165—1179 (1975).
43. *Teale J. M.* Abnormalities in isotype expression in CBA/N mice due to stimulatory environment rather than a B cell defect, *J. Immunol.*, **130**, 72—77 (1983).
44. *Moller J., ed.* T cell clones, *Immunol. Rev.* **54**, 5—266 (1981).
45. *Pierce S. K., Cancro M. P., Klinman N. R.* (1978). Individual antigen specific T lymphocytes: Helper function in enabling the expression of multiple antibody isotypes, *J. Exp. Med.*, **148**, 759—765 (1978).
46. *Pierce S. K., Klinman N. R.* Multiple B cell stimulation by individual antigen specific T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.*, **11**, 71—75 (1981).
47. *Mage R. G.* Allotype suppression in rabbits: Effects of anti-allotype antisera upon expression of immunoglobulin genes, *Transplant. Rev.*, **27**, 84—99. (1975).
48. *Herzenberg L. A., Okamura K., Metzler C. M.* Regulation of immunoglobulin and antibody production allotype suppressor T cells in mice, *Transplant. Rev.*, **27**, 57—83. (1975).
49. *Nutt N., Haber J., Wortis H. H.* Influence of Igh-linked gene products on the generation of T helper cells in the response to sheep erythrocytes, *J. Exp. Med.*, **153**, 1225—1235 (1981).
50. *Gershon R. K., Paul W. E.* Effect of thymus-derived lymphocytes on amount and affinity of anti-hapten antibody, *J. Immunol.*, **106**, 872—874 (1971).
51. *Rodwell J. D., Karush F.* Restrictions in IgM expression. I. The V_H regions of equine anti-lactoside antibodies, *Mol. Immunol.*, **17**, 1553—1561 (1980).
52. *Gearhart P. J., Johnson M. D., Douglas R., Hood L.* IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts, *Nature*, **291**, 29—34 (1981).
53. *Cebra J. J., Fuhrman J. A., Horsfall D. G., Shahin R. D.* Natural and deliberate priming of IgA responses to bacterial antigens by the mucosal route. In: *Seminars in Infectious Diseases*, Vol. 4, *Bacterial Vaccines*, ed. by J. B. Robbins, J. C. Hill, J. C. Sadoff, pp. 6—12. Thieme-Stratton, Inc., New York, 1982.
54. *Moller G., ed.* Immunoglobulin E, *Immunol. Rev.* **41**, 3—314 (1978).
55. *Katz D. H.* Recent studies on the regulation of IgE antibody synthesis in experimental animals and man, *Immunology*, **41**, 1—24. (1980).
56. *Katz D. H.* IgE antibody responses in vitro: From rodents to man, *Prog. Allergy*, **32**, 105—160 (1982).
57. *Tada T.* Regulation of reaginic antibody formation in animals, *Prog. Allergy*, **19**, 122—126 (1975).
58. *Buckley R., Fiser P., Becker W.* In vivo studies of IgE synthesis by human blood mononuclear cells, *Fed. Proc.*, **40**, 2167—2170 (1981).
59. *Teale J. M., Liu F.-T., Katz D. H.* A clonal analysis of the IgE response and its implications with regard to isotope commitment, *J. Exp. Med.*, **153**, 783—792 (1981).
60. *Ishizaka K., Suemura M., Yodoi J., Hirashima M.* Regulation of IgE response by IgE binding factors, *Fed. Proc.*, **40**, 2162—2166 (1981).
61. *Spiegelberg H. L.* Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE, *Immunol. Rev.* **56**, 199—218. (1981).
62. *Freidman W. H., Rabourdin-Combe C., Neauport-Sautes C., Gister R. H.* Characterization and function of T cell Fc receptor, *Immunol. Rev.*, **55**, 51—88 (1981).
63. *Watanabe T., Kimoto M., T., Maruyam S., Kishimoto T., Yamamura Y.* Regulation of antibody response in different immunoglobulin classes. V. Establishment of T hybrid cell line secreting IgE class specific suppressor factor, *J. Immunol.*, **121**, 2113—2118 (1978).

Иммунологическая толерантность

Грегори У. Сискинд

(Gregory W. Siskind)

20.1. Определения

Толерантность (отсутствие иммунного ответа, иммунная ареактивность) определяется как специфическое подавление иммунного ответа, вызванное предварительным введением антигена. Следует заметить, что это функциональное определение, не подразумевающее какого-либо конкретного механизма. Несомненно, толерантность опосредуется несколькими различными путями. В рамках данного определения толерантность является противоположностью анамнестическому, или вторичному, ответу. Следует добавить, что это определение толерантности косвенным образом исключает генетически детерминированную неспособность к иммунному ответу или неиммуногенность антигена. Таким образом, толерантность представляет собой индуцированное подавление иммунного ответа у животных, которые могли бы вырабатывать иммунный ответ на изучаемый антиген, если бы не подверглись воздействию, вызвавшему толерантность.

Из данного определения следует, что любое экспериментальное выявление толерантности требует двух воздействий антигена: первое — вызывающее толерантность, и второе — «разрешающее», когда антиген дается в иммуногенной дозе. Толерантность определяется как подавление иммунного ответа у индивидов, получивших и толерантную, и иммуногенную дозы антигена, по сравнению с иммунным ответом особей, получивших только иммуногенную дозу антигена.

Толерантность может быть либо полной (образование антител не выявляется), либо частичной (наблюдается существенное снижение иммунного ответа). Толерантность может проявляться в подавлении специфичного иммунного ответа, включающего все изотипы и гиперчувствительность замедленного типа, или же предпочтительно влиять на тот или иной класс иммуноглобулинов или тип иммунного ответа. Например, при определенных обстоятельствах (внутривенное введение высоких доз антигена морским свинкам одновременно с введением антигена в полном адъюванте Фрейнда) специфически подавляется гиперчувствительность замедленного типа и образуются антитела класса IgG2; влияние на IgG1-ответ при этом бывает слабым или вовсе отсутствует. Обычно это обозначается как *иммунное отклонение* и, вероятно, может рассматриваться как тип иммунологической толерантности.

Термином *расщепленная (split) толерантность* обозначают ситуацию, в которой удается индуцировать толерантность только к одному эпитопу антигенной молекулы, но не к другим ее детерминантам. Термин может быть применен в отношении толерантности лишь к некоторым, но не всем антигенам, презентированным на поверхности клетки. Нередко исследователи используют этот термин для обозначения феномена, описанного выше как иммунное отклонение.

Состояние иммунологической толерантности, вызванное экспериментально, иногда обозначают как *приобретенную толерантность* в противоположность *естественной*, или *ауто толерантности* (толерантность к «своему»), под которой понимают специфическую иммунологическую ареактивность к аутологичным тканям. Как именно толерантность к «своему» (ауто толерантность) соотносится с различными экспериментальными состояниями приобретенной толерантности, пока не вполне ясно.

Помимо толерантности в современной литературе имеется множество терминов, которые были введены для обозначения ряда частных экспериментальных случаев специфического подавления иммунного ответа, вызванного введением антигена. Термин *иммунологический паралич*, как правило, обозначает специфическое подавление иммунного ответа на полисахарид пневмококка или другие неметаболизируемые антигены, возникающее при введении больших доз антигена. *Ареактивность при белковой перегрузке* обозначает депрессию иммунного ответа, вызванную многократным введением массивных доз белкового антигена. Термин *иммунологическая ареактивность* был первоначально введен для обозначения подавления контактной чувствительности к пикрилхлориду при скормливания животным реактивного гаптена, а сейчас используется как синоним толерантности.

Десенсибилизация — это вызванное введением антигена проходящее подавление эфферентного (эффекторного) звена иммунного ответа. Подавление анафилактической чувствительности исследовалось в большинстве проведенных исследований. Механизм этого явления представляет собой, по-видимому, простое связывание имеющихся антител с антигеном, сопровождающееся выведением комплекса из кровеносного русла, что приводит к специфическому истощению этих антител. При анафилактической чувствительности может происходить «медленное» высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов, покрытых IgE. Поскольку этот процесс не влияет на продуктивную способность, антитела продолжают образовываться и снижение их концентрации носит кратковременный характер. Подобный же, хотя, возможно, и более сложный эффект, может наблюдаться в реакциях гиперчувствительности замедленного типа. Животные с чувствительностью такого типа на время теряют ее после внутривенного введения антигена. Эффект непродолжителен — в большинстве случаев наблюдается менее двух дней. Механизм, лежащий в основе этого явления, изучен плохо, и насколько он соответствует классическим моделям толерантности, неясно. Некоторые случаи десенсибилизации при гиперчувствительности замедленного типа [1—5] могут быть связаны с активацией супрессорных клеток.

В заключение можно сказать, что толерантность определяется как индуцированное антигеном специфическое подавление иммунного ответа. В основе этого процесса, несомненно, лежит несколько различных механизмов. Хотя исторически толерантность рассматривалась как защита против аутоиммунных заболеваний, пока еще не ясно, насколько модели экспериментально индуцированной толерантности соответствуют природной толерантности к собственным антигенам. Вероятно, механизмы, участвующие в экспериментально индуцированной иммунологической толерантности, в действительности более тесно связаны с механизмами, регулирующими нормальный иммунный ответ, чем с механизмами, обуславливающими толерантность к «своему».

В настоящей главе мы обсудим общие проблемы иммунологической толерантности. Также будут затронуты близкие вопросы, касающиеся супрессорных клеток и антиидиотипической регуляторной сети.

20.2. История вопроса

Первое описание иммунологической толерантности, по-видимому, принадлежит Уэллсу и Осборну (Wells, Osborne) [6], которые в 1911 г. сообщили о возможности уменьшения у животных анафилактической чувствительности после скармливания больших доз антигена. В 1923 г. Глэнни и Гопкинс [7] наблюдали у некоторых кроликов уменьшение иммунного выведения гетерологичного гамма-глобулина после введения большой дозы антигена. Сальзбергер и др. [8, 9] в 1929 г. сообщили, что взрослые животные, получившие внутривенно неоарсфенамин, потеряли кожную чувствительность к этому препарату.

Кроме этих ранних спорадических наблюдений несколько исследователей в 40-х и начале 50-х годов детально описали специфически вызванную иммунологическую толерантность. Особого внимания заслуживают исследования, в которых были заложены основы наших эмпирических представлений об иммунологической толерантности. Чейз и др. [10—12] установили, что скармливание морским свинкам химически активного пикрилхлорида приводит к глубокому специфическому подавлению контактной чувствительности (гиперчувствительность замедленного типа), а также антительного ответа на тринитрофенил (ТНФ) при введении ТНФ-белковых конъюгатов. Опыты с переносом клеток выявили у животных, получавших пикрилхлорид, подавление синтеза антител.

Фелтон и др. [13] сообщили, что, хотя при введении мышам низких доз капсульного полисахарида пневмококка (1 мкг или меньше) развивается заметная типоспецифическая защита от последующего введения вирулентного пневмококка, введение высоких доз полисахарида (50 мкг или больше) не только не оказывает защитного действия, но даже приводит к тому, что при последующей иммунизации нормальными иммуногенными дозами антигенов мыши оказываются неспособными к ответу. Состояние ареактивности было длительным. Персистенция у опытных животных этих неметаболизируемых, весьма медленно выводящихся полисахаридных антигенов свидетельствует, очевидно, о том, что видимая ареактивность вызвана связыванием антител имеющимся в организме антигеном [14—16]. Возможно, комплекс антиген — антитело фагоцитируется, антитела разрушаются протеолитически, а полисахариды высвобождаются в интактном состоянии и вновь связывают антитела. Таким образом, отсутствие выявляемых антител может объясняться их связыванием с антигеном, а не подавлением их синтеза. Попытки установить, действительно ли иммунологическая толерантность укладывается в рамки так называемой *гипотезы однообразной иммунизации* или, скорее, гипотезы *центрального угнетения синтеза антител*, потребовали в этот период массу усилий.

Оуэн [17, 18] описал естественно индуцированное состояние толерантности у скота. Фримартинный скот — дизиготные близнецы. Поскольку такие близнецы имеют общую плаценту, то в период эмбрионального развития у них происходит перекрестный обмен кровью. Взрослые особи этой породы подчас оказываются химерными в том смысле, что они содержат эритроциты разных групп крови. Эти химеры толерантны к кожным трансплантатам, пересаженным от их близнецов.

Формальный теоретический фундамент для изучения иммунологической толерантности подвели Бернет и Феннер в 1949 г. [19]. Они предполагали, что, рассматривая иммунный ответ, необходимо различать «свое» и «не свое». Животные, как известно, отвечают образованием антител и гиперчувствительностью замедленного типа на воздействие почти всех чужеродных («не своих») макромолекул, но не дают иммунного ответа на компоненты собственной ткани. Сле-

довательно, они должны уметь отличать «свое» от «не своего» (чужого). Бернет и Феннер считали, что для того, чтобы живой организм был защищен от аутоиммунных реакций, ему необходимо «научиться» различать собственные компоненты еще до созревания своей иммунной системы, которое наступает примерно к рождению. Бернет и Феннер предположили, что в результате воздействия на лимфоидную систему собственных антигенов во время эмбрионального развития (т. е. до созревания иммунной системы) у животного развивается специфическая толерантность к компонентам собственных тканей. Они считали, что при воздействии чужеродного антигена на животное до созревания иммунологической системы (т. е. внутриматочно или сразу после рождения) этот антиген будет восприниматься как собственный и впоследствии не будет вызывать иммунного ответа. В соответствии с такой трактовкой толерантность рассматривается как природный защитный механизм против аутоиммунных заболеваний.

В 1953 г. Биллингем и др. [20] сообщили об индукции толерантности к аллотрансплантатам при внутриматочном или неонатальном введении живых аллогенных клеток селезенки. Толерантность может быть снята переносом иммунных сингенных лимфоидных клеток и, в меньшей степени, переносом нормальных сингенных лимфоидных клеток ареактивным животным [21]. Примерно в то же время Гашек и др. [22—24] обнаружили, что эмбриональный парабриоз куриных яиц через хорионическую мембрану приводит к специфическому состоянию ареактивности. В течение нескольких лет в печати появились многочисленные сообщения об индукции толерантности к множеству нереплицирующихся антигенов (т. е. к гетерологичным белкам и эритроцитам) [25—29]. В этих работах, в которых, как правило, использовались массивные дозы чужеродных антигенов, было обнаружено, что у неполовозрелых животных толерантность вызывается легче, чем у взрослых особей. Оказалось, что в этом случае требуются меньшие дозы антигенов, а толерантность является более глубокой и длительной. В большинстве случаев толерантность не перманентна, ее степень и длительность могут быть различны в зависимости от дозы антигена и прочих деталей процедуры, используемой для индукции толерантности.

Таким образом, к концу 50-х годов стало очевидным, что при определенных условиях толерантность к любому антигену можно вызвать как до созревания иммунной системы, так и у взрослых животных. Изучение роли и механизмов толерантности становится центральной темой в иммунологии в связи с их возможным участием в защите от аутоиммунных процессов и в регуляции иммунного ответа.

20.3. Толерантность, общие сведения

20.3.1. Индукция толерантности

Изучению факторов, от которых зависит, приведет ли введение антигена к возникновению толерантности или же к развитию вторичного ответа, было посвящено множество исследований. Вскоре стало очевидным, что доза антигена, его физические свойства, физиологическое состояние организма и генетические факторы влияют на степень, длительность и клеточные основы состояния толерантности. В большинстве случаев любые условия или процедуры, направленные на снижение иммунного ответа, будут способствовать индукции толерантности. При изучении индукции толерантности необходимо подбирать условия таким образом, чтобы избежать сопутствующей иммунизации [30]. Добавление

иммуногенных форм антигена или адъюванта к толерогену обычно предотвращает возникновение толерантности [31], хотя в некоторых случаях порог индукции толерантности может оставаться неизменным [32].

20.3.1.1. Доза антигена

В ранних исследованиях было выявлено, что доза антигена, превышающая обычный иммуногенный уровень, приводит к толерантности. Чем больше доза антигена, тем выше степень толерантности и тем она длительнее [26, 29, 33—37]. В отношении толерантности В-клеток установлено, что для индукции ареактивности клеток, продуцирующих низкоаффинные антитела, требуется большая доза антигена, чем в случае клеток, продуцирующих высокоаффинные антитела. Для индукции В-клеточной толерантности полимерными антигенами или конъюгатами гаптен — носитель с высокой плотностью эпитопов требуются более низкие дозы антигена. Вероятно, увеличение avidности связывания в результате образования множественных связей между молекулой антигена и поверхностными рецепторами В-клеток облегчает возникновение толерантности, хотя не исключено, что перекрестное связывание рецепторов между собой также играет в этом важную роль.

Последующее детальное изучение зависимости доза — ответ, проведенное Митчисон [38], позволило заключить, что толерантность к белковому антигену (у взрослых мышей) возникает в двух случаях: при дозе антигена выше и ниже иммунизирующей дозы. Эти явления получили название высоко- и низкозонной толерантности. С помощью метода переноса клеток Уэйгл и др. [39] исследовали клеточные основы двух этих форм толерантности. Они установили, что низкозонная толерантность соответствует ареактивности популяции Т-хелперов, тогда как высокозонная толерантность отражает специфическую ареактивность как на уровне популяции Т-хелперов, так и на уровне В-клеток. Как и можно было предсказать, исходя из такого представления о высоко- и низкозонной толерантности, для Т-независимых антигенов обычно не наблюдается двух дозовых зон [32]. Даже для Т-зависимых антигенов не всегда наблюдают нижнюю дозовую зону толерантности [39—41]. Неиммуногенные препараты антигена, подобные ультрацентрифугированному бычьему гамма-глобулину (БГГ), по-видимому, индуцируют лишь одну зону толерантности [42]. Для проявления двухзонной толерантности необходимо, чтобы антиген был иммуногенным или содержал иммуногенные фракции. В противном случае иммунной зоны, разделяющей две зоны толерантности, не наблюдается. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что зрелые Т-клетки более чувствительны к индукции толерантности, чем зрелые В-клетки, поскольку для индукции толерантности Т-клеток требуются в 100—1000 раз меньшие количества антигена [30] (по крайней мере в некоторых экспериментальных моделях).

20.3.1.2. Способы введения антигена

Определенные способы введения антигена, не вызывающие иммунного ответа, приводят к толерантности. В частности, введение химически активных гаптенов в желудок через зонд [10, 11, 43] или в воротную вену (брыжеечная вена) [44] стимулирует возникновение толерантности. Введение многих антигенов через желудочно-кишечный тракт вызывает специфическое уменьшение иммунного ответа при последующем системном введении антигена [6, 45—53]. Механизм подобного эффекта может заключаться в биологической фильтрации, при которой иммуногенный материал удаляется путем фагоцитоза во время про-

хождения через печень. Внутривенное введение конъюгированных с гаптеном сингенных макрофагов индуцирует контактную чувствительность, тогда как внутривенное введение таких клеток вызывает толерантность [54—57].

Хориучи и Ваксман [58, 59] обнаружили, что при введении антигена непосредственно в тимус взрослых крыс у животных развивается толерантность. Механизм этого явления не ясен, но наиболее вероятной представляется активация супрессорных клеток.

20.3.1.3. Свойства антигенов

Как правило, очень легко вызвать толерантность с помощью таких неметаболизированных антигенов, построенных из повторяющихся единиц, как полисахариды. Доза Т-независимых антигенов, слегка превышающая иммуногенную, часто приводит к длительному и глубокому состоянию ареактивности. Нерегулярные линейные сополимеры, состоящие исключительно из D-аминокислот, по-видимому, — более эффективные толерогены, чем соответствующие полимеры L-аминокислот [60]. Кривые зависимости доза — ответ для полимеров D-аминокислот и полисахаридов сходны. Увеличение дозы этих молекул выше дозы, оптимальной для иммунизации, развивает ареактивность. В целом относительно легко вызвать толерантность к растворимым белкам, хотя для этого может потребоваться применение цитотоксических лекарственных препаратов, удаление иммуногенного материала из препарата или использование незрелых животных. Как правило, очень трудно вызвать полную толерантность к вирусным антигенам, однако случаи частичной ареактивности описаны [61—64]. Аналогично обстоит дело с гетерологичными эритроцитами. Хотя в последнее время и появились многочисленные сообщения о выработке к ним толерантности, ареактивность обычно является лишь частичной и быстро сходит на нет, когда введение антигена прекращается.

Классические эксперименты Дрессера [34, 65—69] отчетливо указывают на то, что физические свойства антигена могут влиять на его способность индуцировать толерантность или иммунитет. Изучая индукцию толерантности у взрослых мышей на гетерологичный гамма-глобулин, Дрессер заметил, что ультрацентрифугирование (30 мин при 20 000—30 000 об/мин) позволяет разделить антиген на две фракции: 1) растворимую, преимущественно мономолекулярную, дисперсную, легко вызывающую толерантность в относительно низких дозах (10—200 мкг) и 2) агрегированную фракцию, не индуцирующую толерантности, но, напротив, стимулирующую иммунный ответ. Ряд других исследователей также сообщили об индукции толерантности белками, подвергнутыми ультрацентрифугированию [70—75]. Аналогичное разделение антигена на иммуногенный и толерогенный компоненты можно осуществлять с помощью и солевого фракционирования, и гель-фильтрации [42, 76]. Таким образом, в некоторых случаях индивидуальный антигенный белок можно разделить физическими методами на иммуногенный и толерогенный компоненты. In vivo разделение гетерологичного альбумина на иммуногенную и толерогенную фракции осуществили Фрей и др. [76, 77], использовавшие очистку фагоцитозом («биологическая фильтрация»). Сравнительно медленно фагоцитируемая часть антигенного препарата является высокотолерогенной, в то время как быстро фагоцитируемая часть предположительно иммуногенна. Аналогичное фракционирование гамма-глобулина человека (ЧГГ) in vivo провели Голуб и Уэйгл [42]. Очевидно, быстро фагоцитируемые компоненты соответствуют агрегированной иммуногенной фракции Дрессера, а медленно фагоцитируемый материал —

неагрегированной толерогенной фракции. Некоторые исследователи показали, что можно получить толерогенный препарат, удалив с помощью «биологической фильтрации» *in vitro* иммуногенный материал из образца антигена [78]. В случае разных линий эффективность «биологической фильтрации» *in vitro* различна. Таким образом, ясно, что удаление агрегированного материала из препарата антигена с помощью ультрацентрифугирования наиболее просто и практически доступно для получения высокотолерогенного материала. Не следует, однако, забывать, что препарат агрегированного антигена также может в некоторых случаях вызывать ареактивность под действием, возможно, других механизмов [79—80]. Кроме того, из правила «медленно фагоцитируемая фракция — лучший толероген» есть исключения. Малые количества пневмококкового полисахарида, все еще выявляющиеся в крови мыши через несколько недель после введения антигена, неотличимы от исходного антигенного препарата по способности вызывать иммунитет и толерантность [81].

Существует общая закономерность: уменьшение молекулярной массы антигена при сохранении антигенной специфичности приводит к снижению его способности индуцировать иммунный ответ и повышает его толерогенную активность. Полимеризованный флагеллин (10^4 кДа), мономерный флагеллин (40 кДа) и фрагмент А мономера флагеллина (18 кДа) представляют собой серию из трех компонентов, очевидно содержащих идентичные антигенные детерминанты. По мере уменьшения молекулярной массы наблюдается ослабление иммуногенных и усиление толерогенных свойств [82—85]. Влияние уменьшения длины полимерных молекул исследовано в случае левана [86, 87], полисахарида пневмококка типа III [88] и поливинилпирролидона [89]. В каждом случае иммуногенность падала с уменьшением молекулярной массы. При значениях меньше 10 кДа соединения переставали проявлять иммуногенные свойства. Низкомолекулярные неиммуногенные препараты левана и поливинилпирролидона сохраняли способность легко индуцировать толерантность. Напротив, уменьшение молекулярной массы SIII путем деградации приводило одновременно к потере и толерогенности, и иммуногенности. Это различие, вероятно, связано с различиями в механизмах индукции толерантности под действием данных антигенов.

Что касается минимальных размеров антигена, способного индуцировать толерантность, то Морено и Хэйл [87] установили, что способность линейного фруктозана ($\beta 2 \rightarrow 6$) индуцировать толерантность теряется в интервале мол. массы 5000—1500. Химически инертные гаптены обычно неэффективны в качестве индукторов толерантности *in vivo* [30, 90], тем не менее существует предположение о возможности индуцировать толерантность такими гаптенами [91—94]. Например, при введении новорожденным или взрослым морским свинкам моновалентного конъюгата азобензиларсоната с N-ацетилтирозином подавляется развитие гиперчувствительности замедленного типа, возникающей после введения поливалентного азобензиларсоната, сшитого с политирозином в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ). Аналогично толерантность к NNP может быть вызвана введением неактивного гаптена NNP, связанного с ϵ -амино-*n*-капроновой кислотой (ЕАКК). Интересно отметить, что, хотя мыши, получившие NNP — ЕАКК, и оказываются ареактивными, при разрешающем введении им NNP-лошадиных эритроцитов *in vivo* их спленоциты *in vitro* дают нормальный иммунный ответ. Создается впечатление, что состояние ареактивности легко обратимо. Следует отметить, что, когда толерантность индуцируется химически активной формой того же гаптена (NNP-азид), клетки селезенки остаются ареактивными *in vitro* что указывает на различия в механизмах этого явления. Таким образом, в некоторых исключительных случаях состояние ареактивности

может быть индуцировано низкомолекулярным моновалентным гаптенем, хотя и не известно, остается ли гаптен в моновалентном состоянии *in vivo*.

Было продемонстрировано решающее значение плотности эпитопов для способности Т-независимых антигенов индуцировать толерантность. Как правило, увеличение плотности эпитопов повышает толерогенность препарата антигена и в некоторых случаях уменьшает его иммуногенность. В случае использования конъюгатов пороговое значение плотности эпитопов для индукции толерантности выше, чем для стимуляции иммунного ответа. Можно получить конъюгаты с низкой плотностью эпитопов, обладающие исключительно иммуногенными свойствами и не способные индуцировать толерантность. С другой стороны, некоторые очень высокозамещенные препараты оказались облигатными толерогенами, не способными индуцировать иммунный ответ. Сходные результаты были получены *in vivo* и *in vitro* с конъюгатами полимеризованного флагеллина, левана, линейного декстрана В512, разветвленного декстрана В1299, SIII и D-CL [95—102].

Было показано, что химическая модификация некоторых антигенов изменяет их иммуногенность и толерогенность — часто в противоположную сторону. Например, ацетоацетилирование мономера флагеллина уменьшает его иммуногенность для крыс, несмотря на то что препарат все еще сохраняет способность связывать антитела с нормальной аффинностью и остается толерогенным [103]. Денатурация мочевиной овальбумина (ОВА) и антигена Е амброзии приводит к утрате основных антигенных детерминант, взаимодействующих с В-клетками, о чем свидетельствует потеря способности реагировать с сывороточными антителами к соответствующим нативным белкам [104—105]. Тем не менее модифицированные антигены способны активировать хелперные Т-клетки, требующиеся для антительного ответа на нативный антиген, а также индуцировать толерантность у мышей, примированных нативным антигеном. Денатурированный мочевиной антиген подавляет IgE-ответ более эффективно, чем нативный антиген. Аналогичным образом ацетоацетилированный ОВА способен индуцировать специфическое подавление IgE-ответа на ОВА [106].

20.3.1.4. Физиологическое состояние организма

После исследований, проведенных в 1950 г. Медавара и др. [17, 20—22, 25, 107—109], стало очевидным, что, хотя толерантность можно вызвать и у взрослых животных, значительно легче индуцировать ее у незрелых животных (эмбрионов и новорожденных). Кохен и Торбекке [110], а затем Фридман [111] показали, что введение новорожденным животным зрелых лимфоидных клеток снижает их чувствительность к индукции толерантности. И все же не следует забывать, что эмбрионы и новорожденные животные способны давать иммунный ответ, если доза антигена не является избыточной [112—116].

Механизм, обуславливающий более высокую чувствительность животных к индукции толерантности в период, предшествующий созреванию иммунной системы, оставался непонятным вплоть до 70-х годов, когда в результате серии опытов [117—120] было показано, что и *in vivo*, и *in vitro* незрелые В-клетки (как от новорожденных, так и из костного мозга взрослых) более чувствительны к индукции толерантности большинством антигенов, чем зрелые В-клетки. Так, под влиянием низких концентраций антигена незрелые В-клетки специфически толерировались, в то время как на зрелые В-клетки эти концентрации либо совсем не влияли, либо стимулировали их. По-видимому, повышенная чувствительность к индукции толерантности характерна по крайней мере для одной из стадий созревания В-клеток в ходе онтогенеза. Кроме того, было пока-

зано, что В-клетки новорожденных и взрослых мышей ведут себя весьма различно по отношению к антииммуноглобулинам [121—124]. Чтобы вызвать кэппинг поверхностных иммуноглобулинов у незрелых В-лимфоцитов, требуются значительно более высокие концентрации антииммуноглобулиновых антител. После кэппинга и исчезновения иммуноглобулинов с поверхности зрелых В-клеток наблюдается быстрый их ресинтез. В-клетки новорожденных мышей не в состоянии ресинтезировать поверхностные иммуноглобулины после кэппинга. У незрелых В-клеток кэппинг, вызванный антииммуноглобулинами, приводит к исчезновению поверхностных рецепторов для антигенов. Возможно, в случае рецепторов незрелых В-клеток, перекрестно связанных поливалентным антигеном, кэппинг также приводит к тому, что клетка лишается рецепторов для антигенов и становится толерантной.

Различия между идиотипической супрессией, индуцированной у новорожденных и взрослых животных, также, по-видимому, указывают на существование различий в свойствах «незрелых» и «зрелых» В-лимфоцитов. Клетки, полученные от супрессированных взрослых мышей, после их отмывания и культивирования в присутствии антигена продуцируют супрессированный идиотип. Напротив, в клетках новорожденных супрессированных мышей способность продуцировать идиотип при культивировании *in vitro* не восстанавливается [125]. Аналогично этому при последующем культивировании можно выявить с помощью флюоресцентной микроскопии идиотип на поверхности лимфоидных клеток, полученных от супрессированных взрослых мышей, тогда как на поверхности культивируемых клеток, полученных от мышей, супрессированных неонатально, идиотип не презентирован [125]. На основании полученных результатов можно предположить, что у взрослых животных идиотипическая супрессия обусловлена обратимой блокадой рецепторов, тогда как у новорожденных — клональной делецией. Восстановление способности продуцировать идиотип после клональной делеции зависит от образования новых клеток из предшественников в костном мозге. Очевидно, подобный процесс будет более медленным, чем восстановление после обратимой блокады рецепторов. Это предположение согласуется с тем, что идиотипическая супрессия, индуцированная у новорожденных животных, длится дольше, чем у взрослых [125, 127—129]. Все это, вместе взятое, подтверждает постулат о том, что на некоторой стадии своего развития В-лимфоциты проходят через фазу, в которой они особенно чувствительны к индукции толерантности. Следует заметить, что далеко не все антигены легко индуцируют толерантность у незрелых клеток. Кривые зависимости доза — эффект для индукции толерантности гетерологичным неагрегированным гамма-глобулином одинаковы для эмбриональных и зрелых В-клеток [120]. Следует подчеркнуть, кроме того, что для индукции толерантности у незрелых В-клеток недостаточно простого воздействия на них антигеном. Популяция незрелых В-клеток так же, как и популяция зрелых В-клеток, способна различать толерогенную и нетолерогенную формы антигена [130]. Возможно, в относительной легкости индукции толерантности у животных с еще не созревшей иммунной системой играет роль не только высокая чувствительность незрелых В-клеток, но и другие факторы. Например, как показали Мозир и Джонсон [131], у новорожденных мышей очень активна популяция супрессорных Т-клеток. Кроме того, было высказано предположение, что важную роль в «защите» В-лимфоцитов от возникновения толерантности играет активность Т-хелперов. По-видимому, недостаточная функциональная активность хелперов или макрофагов у новорожденных животных способствует относительной легкости индукции толерантности.

Несмотря на большое количество данных, свидетельствующих о том, что незрелые В-клетки особенно чувствительны к индукции толерантности, сле-

дует указать и на некоторые исключения из этого правила. Так, кривые, описывающие зависимость между дозой полисахарида пневмококка и индукцией толерантности, идентичны у взрослых и незрелых мышей [112]. Это доказано в экспериментах *in vitro* [132]. Аналогично при использовании в качестве толерогена ультрацентрифугированного БГГ не было обнаружено разницы между клетками эмбриональных или новорожденных мышей и клетками взрослых животных [120]. В чем причина нетипичного поведения этих толерогенов — неясно.

Вообще, как правило, индуцировать толерантность у предварительно иммунизированных животных труднее, чем у иммунологически нативных [133]. Это различие, по-видимому, обусловлено несколькими факторами. У иммунных животных имеются увеличенные популяции специфических Т-хелперов и В-клеток памяти. Популяция В-лимфоцитов иммунных животных смещается в сторону большей аффинности, и в результате у них может повыситься чувствительность к стимуляции антигеном. Зрелые клетки памяти животных, контактировавших с антигеном, возможно, относительно устойчивы к индукции толерантности. Антитела, присутствующие в сыворотке иммунизированных животных, могут усилить иммунный ответ, возможно, путем агрегации антигена и облегчения его локализации, блокируя тем самым индукцию толерантности [134]. Изменения в idiotип-антиidiotипической сети, индуцированные предварительным введением антигена, могут стабилизировать способность иммунной системы животного к ответу. Однако многие исследователи успешно индуцировали толерантность у ранее иммунизированных взрослых животных. Как правило, это требовало повторного введения чрезвычайно высоких доз антигена. Исключением является использование неиммуногенных носителей, таких, как наиболее хорошо изученный сополимер D-глутаминовой кислоты и D-лизина (D-Glu-D-Lys, D-GL). Относительно низкие дозы конъюгата (D-GL) легко индуцируют гаптен-специфическую В-клеточную толерантность у мышей, первично иммунизированных D-GL даже в присутствии циркулирующих антител [135—136]. Аналогично гаптен-специфическая толерантность была вызвана у предварительно иммунизированных мышей введением им гаптена, связанного с сингенным или аутологичным носителем (например, глобулином или эритроцитами) [137—140]. Некоторые модифицированные антигены (например, денатурированные мочевиной) неожиданно оказались способными индуцировать ареактивность у предварительно примированных животных, особенно в отношении IgE-ответа [98, 141, 142]. Полисахариды — и как антигены, и как носители — также эффективно индуцируют ареактивность у примированных животных [32, 73].

20.3.1.5. Неиммуногенные и слабоиммуногенные носители

Оказалось, что индукция гаптен-специфической толерантности облегчается, если использовать антигены, неиммуногенные для индивидуальных животных в качестве носителей для гаптенных детерминант. Исследовали несколько типов неиммуногенных носителей: а) сингенные иммуноглобулины, б) сингенные клетки, обычно несущие Ia-антигены, в) чужеродный материал, на который организм хозяина не способен отвечать в силу генетических особенностей; г) чужеродный материал, либо совсем не обладающий иммуногенностью для определения видов — например, D-GL [135, 136, 143—145], полиэтиленгликоль [146, 147], поливиниловые спирты [148—150], либо обладающий слабой иммуногенностью — например, определенные полимеры D-аминокислот и неметаболизируемых полисахаридов [151, 152]. Клеточный механизм индукции толерантности этими препаратами, по-видимому, неодинаков в различных экспе-

риментальных моделях: в некоторых случаях, возможно, действует механизм В-клеточной клональной делеции (как и в случае с D-GL), тогда как в других случаях могут активироваться супрессорные Т-клетки (как в случае с гаптенами на сингенных клетках).

Использованию неиммуногенного сополимера D-GL в качестве носителя для индукции гаптен-специфичной толерантности посвящено очень много работ [135, 136, 153—158]. Толерантность выявляют по отсутствию антигаптовых антител после разрешающей иммунизации иммуногенным гаптен-белковым конъюгатом. Ареактивность индуцируется низкими дозами толерогена (1—10 мкг), характеризуется длительной стабильностью при переносе лимфоидных клеток от толерантных особей к облученным сингенным и легко вызывается даже у животных, предварительно иммунизированных гаптеном. У толерантных животных снижено количество и гаптен-специфических антигенсвязывающих клеток, и клеток, секретирующих антигаптоновые антитела. Супрессорная активность, как правило, не выявляется. Толерантность, по-видимому, обусловлена клональной В-клеточной делецией.

Модель, в известной степени аналогичная использованию неиммуногенных носителей, включает применение аутологичных или сингенных носителей, на которые организм хозяина, вероятно, не отвечает (толерантность к «своему»). Конъюгаты гаптенов с сингенными иммуноглобулинами [121—123, 145, 159—164], эритроцитами или клетками селезенки [168—175] легко индуцируют гаптен-специфическую толерантность.

Толерантность, индуцированная гаптеном, связанным с аутологичными белками, обычно оказывается гаптен-специфической, зависимой от дозы, и влияет как на гиперчувствительность замедленного типа, так и на синтез антител. Состояние ареактивности обычно сохраняется при переносе лимфоидных клеток от толерантных доноров облученным сингенным реципиентам и может быть снято переносом толерантным мышам нормальных сингенных клеток селезенки (но не тимоцитов). Супрессорная активность обнаруживается лишь изредка. Ареактивность в большинстве случаев была обусловлена клональной делецией В-клеток, хотя иногда выявлялась и супрессорная активность Т-клеток. Сингенные IgG (особенно IgG1), по-видимому, наиболее эффективны в качестве носителей для индукции гаптен-специфической толерантности [176]. Не все конъюгаты гаптена с аутологичными белками и клетками толерогенны в одинаковой степени. Пэлей и др. [177] установили, что ДНФ, связанный с мышинным гамма-глобулином (МГГ) через ϵ -аминогруппы лизина, легко индуцирует толерантность. ДНФ же, связанный с МГГ через аминогруппы гистидина или тирозина или ковалентной связью через карбоксильные группы глутаминовой или аспарагиновой кислот, не способен индуцировать толерантность и, следовательно, иммуногенен.

На препаратах гаптенов, конъюгированных с сингенными эритроцитами, показано, что, чем выше плотность эпитопов, тем выше степень толерогенности [140].

Гаптен, конъюгированный с сингенными клетками селезенки, легко индуцирует гаптен-специфическую толерантность. По-видимому, ассоциация чужеродных антигенных детерминант, по крайней мере с некоторыми поверхностными антигенами клетки, вызывает толерантность. Толерантность, индуцированная таким способом, в большинстве случаев обуславливается активностью супрессорных Т-клеток и не может быть индуцирована у бестимусных (nude) мышей или мышей, подвергнутых действию циклофосфида [168—175]. Было замечено, что такие конъюгированные с гаптеном клетки способны индуцировать образование цитотоксичных Т-клеток, чьи эффекторные функции ре-

стриктируются антигенами гистосовместимости класса I [178, 179]. Это свидетельствует о том, что распознавание антигенов H-2 Т-клетками может быть существенно для возникновения специфической супрессорной активности при индукции толерантности [180—183], хотя в конечном счете супрессорные функции, вероятно, рестриктированы по H-2 [184]. Толерантность, опосредуемая супрессорными клетками, подробно рассматривается в гл. 18.

20.3.1.6. Неспецифическая иммунодепрессия

Как правило, любые манипуляции, неспецифически подавляющие иммунный ответ, способствуют возникновению толерантности. Показано, что цитотоксические иммунодепрессивные препараты, такие, как 6-меркаптопурин, амептоптерин, тиогуанин, цитозинарабинозид, акрифлавин и циклофосфамид [185—199], антилимфоцитарная сыворотка (АЛС) [200], сублетальное облучение рентгеновскими лучами [26, 161, 201—204], конкуренция антигенов [205, 206] и дренаж грудной клетки [207] облегчают индукцию толерантности. Грубо говоря, пороговая доза антигена для индукции толерантности у адекватно иммунодепрессированных взрослых животных близка к таковой у новорожденных животных. Обычно высокие дозы иммуносупрессорных антигенов, вызывающие относительно глубокую неспецифическую иммунодепрессию, необходимы только для индукции длительной толерантности. Из всех исследованных неспецифических иммуносупрессивных воздействий обработка циклофосфамидом (примерно 300 мкг на 1 кг веса тела для мышей) за день до введения антигена оказалась наиболее эффективной для облегчения индукции толерантности.

Механизм, при помощи которого неспецифическая иммунодепрессия способствует индукции толерантности, неясен. Существуют следующие возможности: а) предотвращение сопутствующей иммунизации при введении антигена; б) деструкция зрелых периферических лимфоидных клеток, приводящая к сдвигу в сторону незрелой клеточной популяции, которая, как известно, более чувствительна к индукции толерантности; в) сдвиг в соотношении хелперных (или супрессорных) Т-клеток, в результате которого супрессия становится доминантной; г) предпочтительное уничтожение клеток, стимулированных антигеном к пролиферации. Вероятно, при использовании разных иммунодепрессантов, разных толерогенов и разных способов их введения механизмы их действия также различны. Например, толерантность к бараньим эритроцитам, индуцированная циклофосфамидом, в основном определяется ареактивностью Т-клеток, о чем свидетельствуют результаты опытов по переносу клеток и данные о способности тимэктомизированных животных к медленной реверсии [193—195]. И это при том, что введение одного только циклофосфамида (для развития неспецифического иммунодепрессивного эффекта) преимущественно обедняет животное В-лимфоцитами. С другой стороны, Говард и Коуртенау [196] установили, что в случае с относительно Т-независимыми полисахаридными антигенами циклофосфамид является наиболее эффективным из иммунодепрессантов по способности облегчать индукцию толерантности. Это свидетельствует о прямом действии на В-лимфоциты и показывает, что облегчение индукции толерантности этими антигенами нельзя объяснить лишь подавлением иммунного ответа вследствие уничтожения быстроделющихся клеток. Кроме того, группа Говарда установила, что способность циклофосфамида облегчать индукцию толерантности связана с толерогенными свойствами антигена, а не с его иммуногенной способностью. Интересно, что, хотя лимфоидные клетки мыши, обработанные циклофосфамидом, нормально кэспируются под воздействием кроличьей сыворотки против мышинных иммуноглобулинов, они ведут себя как

незрелые В-клетки в том смысле, что у них отсутствует способность к реэкспрессии поверхностных иммуноглобулинов.

Некоторые исследователи отметили способность кортикостероидов, введенных совместно с толерогеном и облучением рентгеновскими лучами или с циклофосфамидом, предотвращать индукцию толерантности [208, 209]. Кортикостероиды, как известно, вызывают элиминацию незрелых предшественников Т-лимфоцитов, находящихся в участках коркового слоя тимуса [210, 211]. Возможно, кортикостероиды предотвращают индукцию толерантности путем угнетения предшественников супрессорных Т-клеток.

Механизм, облегчающий индукцию толерантности при введении АЛС, не установлен. Существует предположение, что хелперные Т-клетки «защищают» В-клетки от индукции толерантности. Если это так, то влияние АЛС на индукцию толерантности может быть обусловлено элиминацией хелперных Т-клеток. Как и следовало ожидать, данных об усилении индукции толерантности к Т-независимым антигенам под действием АЛС пока нет.

Многие из процедур, облегчающих индукцию толерантности (АЛС, цитотоксические препараты, облучение рентгеновскими лучами, дренаж грудного протока), приводят к истощению запаса зрелых периферических лимфоидных клеток у животного. Последующее заселение лимфоидной системы клетками, возникающими вновь в костном мозге, приводит к временному появлению популяции «менее зрелых» лимфоидных клеток, которые могут быть более чувствительными к индукции толерантности.

20.3.1.7. Использование химически реактивных гаптенов для индукции толерантности

Множество исследователей показали, что введение животным с пищей внутривенно или внутрибрюшинно [10, 212, 213, 217] химически активных гаптенов приводит к возникновению специфического состояния иммунологической ареактивности. Обычно такая ареактивность является гаптен-специфической, длительной (до 38 недель) и зависимой от дозы введенного гаптена. Многократное введение гаптена продлевает состояние ареактивности. Наблюдается подавление и гиперчувствительности замедленного типа, и синтеза антител. Опытами по переносу клеток от толерантного животного в свободную от антигена среду было показано, что состояние ареактивности устойчиво [218]. Имеются данные о роли Т-супрессоров при толерантности этого типа [219]. Индукция толерантности таким способом, возможно, сравнима с индукцией толерантности гаптенами, конъюгированными с аутологичными или сингенными клетками.

20.3.1.8. Влияние генетических факторов на индукцию толерантности

Имеется множество сообщений о том, что легкость индукции толерантности у животных разных линий различна [44, 220—225]. Особенный интерес представляют данные о том, что по отношению к некоторым (но далеко не всем) антигенам предрасположенные к аутоиммунным заболеваниям мыши линий NZB или NZB/NZW практически устойчивы к индукции толерантности [226]. Существует, вероятно, множество разных соображений о роли генетически детерминированных различий в легкости индукции толерантности. В некоторых случаях гены иммунного ответа, кодируемые главным комплексом гистосовместимости, влияют на индукцию толерантности опосредованно, способствуя

активации супрессорных клеток или делая некоторые носители неиммуногенными у животных определенных линий. Гены, ответственные за возникновение иммунного ответа, рассматриваются в гл. 16. Непрямые данные свидетельствуют о том, что специфичные для линий различия в легкости возникновения толерантности могут быть связаны с различиями в функционировании макрофагов [224, 225].

20.3.1.9. Кинетика индукции толерантности

В отличие от относительно короткого времени, необходимого для индукции толерантности *in vitro*, *in vivo*, эти сроки сильно варьируют, и во многих случаях для индукции толерантности требуется значительно более длительный период. При изучении кинетики индукции толерантности *in vivo* обычно используется метод переноса клеток. У животных вызывают толерантность, после этого через различные промежутки времени их забивают и отмытые лимфоциты переносят облученным иммунизированным реципиентам.

При использовании высоких доз полисахарида пневмококка или свободного от агрегатов ЧГГ для индукции толерантности обычно требуется 4—5 дней [227, 228], хотя некоторые исследователи сообщают о более длительных сроках [200]. Митчисон [40], напротив, показал, что при использовании высоких доз бычьего сывороточного альбумина (БСА) лимфоциты периферической крови взрослых мышей уже через 2 ч становятся толерантными. Для индукции толерантности у лимфоцитов селезенки необходимо несколько большее время — примерно 24 ч. Аналогично Дас и Лесковиц [223] обнаружили некоторое уменьшение способности к ответу через 4 ч после введения БГГ, не содержащего агрегатов. Чиллер и Уэйгл [229] отметили, что после введения лишенного агрегатов ЧГГ популяция клеток селезенки становилась толерантной через 6 ч, но полная ареактивность развивалась только через 5 дней. Вообще увеличение дозы толерогена не влияло на скорость индукции толерантности [200, 230]. Различия в скорости индукции толерантности скорее всего объясняются существованием нескольких различных механизмов, ответственных за этот процесс.

Многочисленные исследования были направлены на изучение кинетики индукции толерантности у различных популяций лимфоцитов [231]. Создается впечатление, что периферические Т-лимфоциты и Т-лимфоциты тимуса приобретают толерантность очень быстро и, вероятно, с одинаковой скоростью. Популяция В-клеток становится толерантной *in vivo* более медленно, чем популяция Т-клеток. У популяции В-лимфоцитов селезенки толерантность развивается быстрее, чем у популяции В-клеток костного мозга. Однако данные по индукции толерантности у В-клеток так различны, что обобщить их очень сложно. Толерантность к ЧГГ у В-клеток селезенки индуцируется менее чем за 3 дня [232], тогда как для возникновения ареактивности у популяции В-клеток костного мозга требуется от 8 до 15 дней. Для индукции толерантности к лизоциму у популяции В-лимфоцитов требуется 2 недели [233], а Т-клеточная толерантность к этому антигену устанавливается быстро. Известно несколько примеров быстрой индукции толерантности у В-клеток. Леван индуцирует у мышей частичную толерантность через 6 ч после введения и полную толерантность через 24 ч [234]. У В-клеток, примированных ДНФ, толерантность к этому антигену индуцируется в течение 1 ч при использовании в качестве толерогена ДНФ-D-GL [155].

20.3.1.10. Образование антител при индукции толерантности

Опубликовано множество данных относительно образования антител при индукции толерантности [32, 227, 235—245]. Хотя образование антител может отражать сопутствующий иммунный ответ и никак не быть связано с индукцией толерантности, в некоторых случаях этот процесс может иметь важное значение именно для индукции толерантности.

Был предложен механизм толерантности типа «истощающая терминальная дифференцировка», при котором практически все клетки данной специфичности стимулируются к дифференцировке в плазматические клетки без увеличения пула клеток памяти. В результате происходит истощение отвечающих В-клеток и у животного развивается толерантность, сохраняющаяся до тех пор, пока не произойдет регенерации специфических В-клеток за счет предшественников из костного мозга. Предположение о том, что терминальная дифференцировка представляет собой механизм индукции толерантности, исходно возникло из следующего наблюдения: чем выше доза антигена, введенного новорожденным животным для индукции толерантности, тем выше и начальное образование антител, и степень толерантности, наблюдаемые при последующем, разрешающем введении антигена [246, 247]. Исследования, проведенные Говардом и др. [241], свидетельствуют в пользу предположения, что одним из механизмов толерантности к Т-независимым полисахаридным антигенам является терминальная дифференцировка.

Вероятно, антитела, продуцируемые в ответ на введение антигена в толерогенной дозе, косвенным образом способствуют индукции ареактивности. Было показано, что комплексы антиген — антитело, по крайней мере *in vitro* [248, 249], высоко толерогенны. Антитела или комплексы антиген — антитело могут также индуцировать антиидиотипические антитела (или идиотип-специфические супрессорные Т-клетки), которые уменьшают иммунный ответ и вызывают состояние, подобное толерантности.

Необходимо, однако, подчеркнуть, что, согласно многочисленным сообщениям, при индукции толерантности не наблюдается образования антител [140, 229—231]. Таким образом, синтез антител, очевидно, не является обязательным для индукции всех форм толерантности.

20.3.1.11. Индукция толерантности *in vitro*

Целый ряд исследователей сообщили об индукции ареактивности при культивировании лимфоидных клеток в присутствии толерогена. Ареактивность может быть продемонстрирована либо при последующих попытках проиммунизировать клеточную популяцию *in vitro*, либо путем переноса культивируемых клеток облученным реципиентам, которым затем вводят иммуноген. Есть основания полагать, что условия, необходимые для индукции толерантности *in vivo* и *in vitro*, зачастую различаются. Следовательно, вполне возможно, что в этих двух случаях действуют разные механизмы. Индукция толерантности *in vitro* наиболее часто достигается тимус-независимыми антигенами, вызывающими преимущественно IgM-ответ.

Следует отметить, что индукция толерантности *in vitro* обычно происходит быстрее, чем *in vivo*. Так, при культивировании клеток в присутствии антигена в соответствующих условиях толерантность индуцируется в течение нескольких часов, тогда как у интактных животных это занимает несколько дней [155, 167, 235, 236, 250—255].

In vitro индукция В-клеточной толерантности может быть блокирована антисывороткой к иммуноглобулинам или к легким цепям [239, 256, 257], а также обработкой клеток протеолитическими ферментами до или вскоре после воздействия толерогена [239, 258]. Как правило, с увеличением плотности эпителиальных гаптен-несущих конъюгатов повышается и их способность индуцировать В-клеточную толерантность *in vitro* [257]. Конъюгаты с очень высокой плотностью эпителиальных гаптен-несущих конъюгатов являются иммуногенами и скорее всего не способны индуцировать толерантность. Конъюгаты с промежуточной плотностью эпителиальных гаптен-несущих конъюгатов ведут себя как иммуногены при низких концентрациях, но индуцируют толерантность при высоких концентрациях. Аналогичные данные получили Говард и др. [241], исследовавшие индукцию толерантности *in vivo*. Увеличением плотности эпителиальных гаптен-несущих конъюгатов может объясняться, по крайней мере отчасти, высокая толерогенность комплекса антиген — антитело *in vitro* [145, 151]. Перекрестное связывание поверхностных рецепторов для антигенов и Fc-рецепторов также может повышать эффективность комплексов антиген — антитело при индукции толерантности. О способности комплексов антиген — антитело индуцировать толерантность *in vitro* свидетельствуют следующие данные. При добавлении небольших количеств специфических антител к культуре, содержащей антиген и мышинные клетки селезенки, иммунизирующая концентрация полимеризованного флагеллина превращалась в толерогенную, и фрагмент А флагеллина, обычно не способный индуцировать неактивность *in vitro*, становился мощным толерогеном. Однако этот эффект наблюдался только в узком интервале соотношений антиген — антитело, и никаких подтверждений тому, что *in vivo* толерантность индуцируется таким же образом, не имеется.

В ряде моделей толерантности *in vitro* предполагается стимуляция супрессорных клеток. Роль супрессорных клеток рассматривается в гл. 18.

Существуют некоторые необъяснимые различия между моделями толерантности *in vivo* и *in vitro*. Например, некоторые антигены, относительно легко индуцирующие толерантность *in vitro*, при испытании *in vivo* оказывались частично иммуногенными (например, полимеризованный флагеллин и эндотоксин) [250, 258]. Индуцировать толерантность у иммунных животных *in vivo* очень трудно, тогда как *in vitro* в некоторых случаях это достигается легко [250, 258]. Наконец, индукция толерантности протекает быстрее *in vitro* (1—6 ч), чем *in vivo* (несколько дней). В целом легче индуцировать толерантность к белкам *in vivo*, чем *in vitro*, тогда как Т-независимые антигены, особенно при высокой плотности эпителиальных гаптен-несущих конъюгатов (например, полисахариды, высоко конъюгированные ДНФ—POL), и комплексы антиген—антитело, видимо, особенно эффективны при индукции толерантности *in vitro*.

20.3.2. Отмена толерантности

За исключением аллотрансплантационной толерантности, индуцированной живыми аллогенными (или чаще полуаллогенными) клетками, когда может быть достигнут устойчивый химеризм, толерантность не носит постоянного характера, хотя временами она может быть очень длительной. Выход из состояния толерантности бывает либо спонтанным, либо индуцированным.

Продолжительность толерантности можно увеличивать периодическим введением антигена [29, 107, 259]. Таким образом, длительное поддержание по крайней мере некоторых форм толерантности требует, по-видимому, персистенции антигена или повторных его введений [260—264]. Однако толерантность не исчезает, конечно, мгновенно при устранении толерогена. Так, толерант-

ность будет сохраняться после переноса клеток от неответающего донора в среду, не содержащую антигена (in vitro в культуру или in vivo реципиентам) или даже после полного выведения всех толерогенов из организма хозяина [264—267]. В ситуации, когда толерантность обуславливается активностью супрессорных клеток, она может сохраняться в течение длительного периода после исчезновения толерогена. В тех случаях, когда толерантность бывает вызвана клональной делецией, выхода из толерантности не произойдет до тех пор, пока «истощенные» клоны клеток не будут замещены вновь образующимися из предшественников костного мозга. В основе вывода о повышенной чувствительности незрелых В-клеток к индукции толерантности лежит тот факт, что для продления ареактивности у толерантных животных требуются более низкие дозы толерогена, чем для индукции толерантности у интактных животных.

20.3.2.1. *Могут ли лимфоидные клетки переключаться от состояния ареактивности к состоянию реактивности?*

По крайней мере при некоторых формах толерантности В-клетки, по-видимому, способны переключаться от ареактивности к реактивности. Это было установлено при переносе клеток от толерантных доноров в среду, лишенную антигена (в тканевую культуру или облученным реципиентам) [268—273]. Хотя некоторые случаи можно объяснить угнетением активности Т-супрессоров, в других случаях явно наблюдается существенное изменение функциональной активности В-клеток. Это явление объясняют диссоциацией антигена с рецепторов клеточной поверхности. Вообще толерогены, способные образовывать устойчивые поливалентные связи с поверхностными рецепторами, индуцируют необратимую ареактивность, тогда как антигены, не образующие таких связей, диссоциируют, обуславливая тем самым восстановление реактивности. Такой тип обратимого ареактивного состояния называют *блокадой рецепторов*.

Шрадер и Носсал [274—276] описали подавление секреции антител В-клетками вследствие перекрестного связывания рецепторов клеточной поверхности поливалентными молекулами антигена. Эта так называемая эффекторная клеточная блокада снималась после обработки клеток ферментами, расщепляющими перекрестные связи с лигандом.

Нами было недавно показано, что антиидиотипические антитела способны обратимо угнетать секрецию антител В-клетками [277—280]. Секреция антител восстанавливается после короткой инкубации клеток, обработанных антиидиотипическими антителами в присутствии низких концентраций гаптена, «конкурирующего» с антиидиотипическими антителами за рецепторы клеточной поверхности.

Итак, в некоторых системах ингибированные В-клетки могут восстанавливать свои функции после удаления ингибирующего агента. Хотя механизмы действия супрессорных Т-клеток в деталях не изучены, кажется очевидным, что их супрессирующие эффекты (down regulation) также обратимы. Во многих случаях «толерантные» клетки могут вновь стать реактивными и нормально функционировать. Существуют ли при толерантности, вызванной клональной делецией, клетки, функции которых могут быть восстановлены после соответствующей обработки, пока не известно.

20.3.2.2. *Спонтанная отмена толерантности*

По мере увеличения промежутка времени между индукцией толерантности и введением разрешающей дозы иммуногена у животного постепенно восстанавливается способность к образованию антител. Вообще чем выше доза

толерогена, тем длительнее состояние ареактивности. Особенно нагляден этот эффект в случае применения слабометаболизируемых полисахаридных антигенов. Возможно, доза антигена влияет и на длительность толерантности к белковым антигенам, но в меньшей степени [106, 107]. Вариации в длительности толерантности при использовании различных антигенов и при разных способах индукции толерантности могут объясняться разнообразием механизмов толерантности.

Кроме природы антигена и его дозы на длительность толерантности оказывает влияние также и возраст животного. У молодых животных восстановление способности к иммунному ответу происходит раньше и с большей скоростью [281, 282].

При использовании Т-зависимых антигенов возвращение к реактивности иногда удавалось задержать с помощью тимэктомии [283, 284]. Вероятно, в этих случаях толерантность определяется ареактивностью популяции Т-хелперов. Напротив, с Т-независимыми полисахаридными антигенами тимэктомия обычно не приводит к исчезновению толерантности [91, 285].

Ряд исследователей отметили, что после исчезновения толерантности животное начинает спонтанно продуцировать антитела к антигену, к которому предварительно была вызвана толерантность, или же дает вторичный ответ на разрешающее введение этого антигена [105—106, 282, 286, 287]. Хотя такой эффект распространяется как на Т-независимые полисахаридные антигены, так и на Т-зависимые белковые антигены, данное явление не универсально [265, 282]. Так, этот эффект отсутствует у старых животных, а также при отмене толерантности, вызванной низкой дозой толерогена. Авидность антител, продуцируемых после спонтанного прекращения толерантности, обычно с течением времени увеличивается, что типично для нормального первичного ответа [288—291]. Хотя в настоящее время механизм спонтанного иммунного ответа, который часто встречается при прекращении толерантности, не установлен, обычно считают, что он представляет собой ответ на функциональный иммуноген, присутствующий, как показано, в организме животных во время прекращения толерантности [282].

Уэйгл и сотрудники сравнили кинетику восстановления реактивности у популяций Т- и В-клеток. Как правило, восстановление быстрее протекает у популяции В-клеток. Так, через длительное время после индукции толерантности (около 4 мес) популяция В-клеток может приобрести нормальную или даже повышенную реактивность [246], тогда как состояние толерантности у животных поддерживается благодаря специфической ареактивности популяции Т-лимфоцитов. В этом случае потеря толерантности интактными животными отражает восстановление реактивности у популяции Т-лимфоцитов.

После облучения восстановление нормального уровня образования В-клеток из стволовых протекает сравнительно быстро и завершается в течение трех недель [292, 293]. Напротив, выход В-клеток из состояния толерантности протекает весьма медленно и требует двух и более месяцев [30]. Это означает, что помимо простого замещения делеционных клонов в процесс выхода из толерантности вовлечен комплекс других факторов. До тех пор пока толероген персистирует в организме животных на необходимом уровне, состояние толерантности поддерживается индукцией ареактивности у вновь образующихся, чувствительных к толерантности незрелых В-клеток. Супрессорная активность Т-клеток, антиидиотипические антитела, или изменения в идиотип-антиидиотипической сети Т- и В-клеток могут привести к тому, что толерантность продлится на больший срок, чем время, необходимое для регенерации делетированных клонов В-лимфоцитов, даже в отсутствие персистирующего толерогена.

20.3.2.3. Экспериментально индуцированная отмена толерантности

Попытка вызвать преждевременную отмену толерантности потребовала значительных усилий. Применяемые процедуры были направлены на ускоренное снижение уровня толерогена у животных, повышение скорости обновления лимфоидных клеток, элиминацию супрессорных клеток, стимуляцию перекрестно-реагирующей клеточной популяции или «обход» толерантных Т-лимфоцитов. Использовали следующие экспериментальные подходы: а) перенос нормальных лимфоидных клеток, б) пассивные антитела, в) деградирующие ферменты, г) адъюванты и поликлональные активаторы В-клеток, д) облучение рентгеновскими лучами, е) циклофосамид, ж) парабиоз, з) реакцию «трансплантат против хозяина» и и) иммунизацию перекрестно-реагирующими или модифицированными антигенами.

При обсуждении методов, приводящих к явной отмене толерантности, следует иметь в виду следующее: все, что было продемонстрировано в большинстве исследований, относится лишь к образованию антител (или гиперчувствительности замедленного типа), специфичных к антигену, вызвавшему толерантность. Из этого не следует, что в процесс включаются те же самые клоны, которые в нормальных условиях отвечали бы на антиген. Поэтому реверсия толерантности на уровне организма не означает превращения ареактивных клеток в реактивные. В отсутствие детальных исследований (например, аффинности, гетерогенности, идиотипа, аминокислотных последовательностей) невозможно заключить, является ли иммунный ответ ранее толерантных животных точно таким же, как у интактных особей.

20.3.2.4. Перенос нормальных или иммунных клеток

Переносом лимфоидных клеток от нормальных или иммунных животных можно отменить установившееся состояние ареактивности в результате замещения клеток того типа, который был элиминирован у толерантных особей. Такой перенос скорее всего будет приводить к отмене толерантности, обусловленной клональной делецией, но не будет влиять на толерантность, обусловленную активностью супрессорных клеток. Толерантность к гомотрансплантатам может быть отменена после переноса клеток лимфоидных узлов от нормальных или, что более эффективно, от иммунных доноров ареактивным животным [21, 294—296]. Напротив, несколькими исследователями было обнаружено, что введение нормальных лимфоидных клеток животным, толерантным к нереплицирующимся антигенам (белки и бараньи эритроциты), обычно не восстанавливает реактивность, если только переносу клеток не предшествовало облучение реципиентов сублетальными дозами [42, 261, 297, 298]. Неспособность перенесенных клеток восстанавливать реактивность у необлученных толерантных животных свидетельствует о том, что ареактивность обусловлена действиями супрессорных Т-клеток, антиидиотипических антител или других активных супрессорных механизмов. Однако необходимо иметь в виду и ту возможность, что перенесенные клетки «не находят себе места» и не персистируют у реципиентных животных.

Толерантность в случае контактной чувствительности к динитрохлорбензолу (ДНХБ), индуцированная у взрослых морских свинок путем внутривенного введения динитробензилсульфоната, может быть снята парабиозом с предварительно сенсибилизированным животным [299]. Однако парабиоз с интактной, несенсибилизированной морской свинкой не снимал толерантности; в дей-

ствительности интактные животные становились ареактивными. Напротив, Золла и Наор [300] установили, что парабриоз мышей, толерантных к ЧГГ, с интактными животными приводит к гиперреактивности обоих животных при введении им агрегированного ЧГГ. Смысл этих результатов заключается в том, что при использовании в качестве модели ДХНБ толерантность опосредована супрессорным механизмом, тогда как в случае ЧГГ — клональной делецией. Эти выводы хорошо согласуются с большим количеством других данных об указанных формах толерантности.

20.3.2.5. Элиминация толерогена

Многие исследователи пытались установить, влияет ли на длительность толерантности быстрое выведение антигена, достигаемое пассивным поступлением антител или действием деградирующих ферментов. В большинстве случаев никакого эффекта не было обнаружено [301—305]. Однако Митчисон [265] и Дрессер [220] обнаружили несколько более быструю потерю толерантности при пассивном введении антител. Можно заключить, что пассивные антитела оказывают лишь небольшое, а часто практически незаметное влияние на скорость утраты толерантности. Существует предположение, что такое действие пассивных антител обусловлено выведением из организма толерогена, приводящим к предотвращению индукции ареактивности у вновь образующихся, потенциально иммунокомпетентных клеток. Возможность того, что пассивные антитела способны вызывать сдвиги в идиотип-антиидиотипической сети, а следовательно, и отмену толерантности, не исследовали.

20.3.2.6. Использование адъювантов и стимуляторов образования «фактора»

Агенты, неспецифически стимулирующие пролиферацию клеток или стимулирующие образование факторов, необходимых для развития иммунного ответа, могут запускать образование антител у ареактивных животных в зависимости от механизма возникновения ареактивности и конкретной активности стимулятора. Так, ареактивность, вызванная клональной делецией Т-хелперов, может быть снята «обходными путями»: а) обеспечением В-клеток сигналом, в норме подаваемым Т-хелперами или продуцируемыми ими факторами, или б) стимуляцией образования Т-клетками или другими клетками фактора, необходимого для пролиферации или дифференцировки В-клеток. Другие стимуляторы, возможно, изменяют толерантность, нарушая баланс между супрессорной и хелперной активностями.

Было исследовано множество различных адъювантов в плане их способности отменять состояние иммунологической ареактивности. Полученные результаты весьма различны. Например, иммунизация крыс, толерантных к флагеллину, антигеном в ПАФ стимулирует синтез антифлагеллиновых антител [306]. Имеются данные о том, что обработка эндотоксином не изменяет установившегося состояния толерантности [307, 308]. Однако Чиллер и Уэйгл [287] обнаружили возможность отмены толерантности эндотоксином в том случае, если у животных имеется нормальная реагирующая популяция В-клеток, но ареактивная популяция Т-клеток (в случае низкочетной толерантности и на поздних стадиях высокочетной толерантности). Таким образом, способность эндотоксина вызывать отмену толерантности, по-видимому, заключается в том, что он может обходиться без Т-клеток при стимуляции образования антител В-клетками. Как и предполагалось, толерантность к Т-независимым ан-

тигенам не может быть вообще отменена поликлональными активаторами В-клеток.

Было четко показано, что реакция «трансплантат против хозяина» (аллогенный эффект) или использование супернатантов смешанной культуры лимфоцитов могут усиливать иммунные ответы [309, 310], возможно, путем стимуляции Т-лимфоцитов к образованию факторов, необходимых для пролиферации других Т- и В-клеток. В ряде работ установлено, что введение аллогенных клеток может приводить по крайней мере к частичной отмене толерантности и к образованию IgM-антител [311, 312]. Ряд исследователей показали, что облученные или обработанные митомицином аллогенные клетки так же эффективны, как и живые клетки [313].

20.3.2.7. Обработка цитотоксическими агентами

Известно несколько примеров снятия толерантности при воздействии агентами, вызывающими гибель клеток. В большинстве случаев выход из толерантности при такой процедуре можно объяснить элиминацией супрессорных Т-клеток. В некоторых случаях вспышка клеточной пролиферации, сопровождающаяся гибелью клеток от облучения или других причин, может способствовать восстановлению реактивности.

Обработка циклофосфамидом восстанавливает толерантность в случае контактной чувствительности к динитрохлорбензолу, индуцируемой у взрослых морских свинок внутривенным введением высоких доз динитробензилсульфоновой кислоты [314, 315]. Вероятно, в этом случае толерантность опосредована активностью супрессоров Т-лимфоцитов, и, возможно, ее подавление с помощью циклофосфамида происходит в результате гибели (или ингибирования) супрессорных клеток [316].

В ряде работ было продемонстрировано, что у толерантных животных после облучения в сублетальных дозах скорость восстановления реактивности увеличивалась [266, 317—320]. В других работах, однако, облучение не влияло на длительность толерантности [38, 255, 266, 302, 331—324]. Клэман и Мак-Дональд [322] наблюдали ускоренную потерю толерантности к БГГ у мышей после сублетального облучения, но только у животных с интактным тимусом. Анализ этих противоречивых результатов свидетельствует о том, что в случае полной толерантности животных облучение либо совсем не влияет на нее, либо влияет незначительно. Но при частичной (или спонтанно восстановленной) толерантности облучение может до некоторой степени увеличивать скорость восстановления нормальной реактивности. Объясняется ли это вспышкой пролиферации, гибелью супрессорных Т-клеток, освобождением факторов, необходимых для нормального иммунного ответа, или какими-то иными причинами, неясно.

20.3.2.8. Иммунизация перекрестно-реагирующими антигенами

Состояние полной ареактивности может быть легко снято иммунизацией химически измененными или перекрестно-реагирующими антигенами. Это явление описано в ряде работ [323—332]. Оно было весьма основательно изучено Уэйглом и др. [320, 333—339]. Как подчеркивает Уэйгл, термин *отмена толерантности* относится всего лишь к эмпирическому наблюдению за иммунным ответом, проявляющимся в том, что животное продуцирует антитела, реагирующие с антигеном, к которому данное животное ранее было ареактивным, и ничего не говорит о механизме данного явления.

Уэйгл [333, 335] обнаружил, что иммунизация комплексами антиген—антитела, денатурированным нагреванием БСА, гидролизированным пепсином БСА или БСА, сшитым с отдельным гаптенем (ацетил, пикрил, арсанлат и сульфанилат), не приводит к потере индуцированной у новорожденных толерантности к БСА. С другой стороны, иммунизация БСА, к которому присоединены две различные гаптенные группы (ацетил и пикрил или арсанлат и сульфанилат), отменяет толерантность. Чем выше степень замещения гаптенем, тем эффективнее гаптен-белковый конъюгат в качестве агента, отменяющего ареактивность к белку-носителю [340]. Аналогично, когда толерантность «терминируется» иммунизацией перекрестно-реагирующим белком, больший эффект достигается при использовании наименее сходных белков [291, 294]. При отмене толерантности вследствие иммунизации белками, связанными с гаптенем, образуются антитела к новым эпитопам конъюгата, а также к эпитопам производного белка и исходного белка, вызвавшего толерантность [341]. Когда толерантность к БСА снимается иммунизацией перекрестно-реагирующим альбумином, все продуцируемые антитела к БСА полностью адсорбируются этим альбумином [337, 342] даже после повторной иммунизации БСА [334, 343]. Таким образом, отмена толерантности, очевидно, заключается в стимуляции только перекрестно-реагирующих антител.

Многие исследователи наблюдали отмену толерантности после иммунизации животных комплексом, содержащим гетерологичные специфические антитела и антиген, использованный для индукции толерантности [344—347].

Механизм потери толерантности к Т-зависимым антигенам в результате иммунизации перекрестно-реагирующими или модифицированными антигенами, возможно, связан с введением в молекулу новых антигенных детерминант, стимулирующих специфические Т-хелперы с нормальной активностью. Популяция В-клеток реагирует со всеми детерминантами антигена, используемого для отмены толерантности, включая детерминанты, имеющиеся и у антигена, ранее использованного для индукции ареактивности. Необходимое условие для потери толерантности при использовании этого метода — это наличие популяции реактивных В-лимфоцитов у животного, чьи хелперные Т-клетки ареактивны (т. е. толерантность, обусловленная полной клональной делецией Т-хелперов) [341]. Если механизм отмены толерантности перекрестно-реагирующими антигенами действительно верен, то характер антител, появляющихся при отмене толерантности, будет зависеть от того, существовала ли какая-нибудь В-клеточная толерантность, и от того, как Т-клетки влияют на селекцию отвечающих В-клеток. Некоторые исследователи установили, что антитела, продуцируемые при иммунизации толерантных животных перекрестно-реагирующими антигенами, неотличимы от антител, продуцируемых интактными животными [348], однако в ряде случаев между ними были обнаружены явные различия [326]. Антитела толерантных животных обладали более низкой аффинностью [293] и реагировали с эпитопами антигена, вызвавшего толерантность, на которые интактные животные обычно не отвечают [327].

20.3.3. Антитела, продуцируемые частично толерантными животными

Поскольку толерантность определяется скорее количественно, чем по принципу «все или ничего», необходимо выяснить, есть ли изменения в количественных характеристиках антител, продуцируемых частично толерантными животными. Часто наблюдаются сдвиги в относительном образовании

различных изотипов. Так, синтез IgG-антител во многих случаях подавляется значительно сильнее, чем синтез IgM.

Ряд исследователей установили, что частично толерантные животные продуцируют антитела с более низким средним аффинитетом, чем нативные животные [349—351]. Таким образом, толерантность, по-видимому, предпочтительно влияет на образование антител с высокой аффинностью. Возможно, это объясняется действием (совместным или раздельным) нескольких различных механизмов. В-клетки, несущие высокоаффинные рецепторы к антигенам (и после активации дающие начало клеткам, секретирующим высокоаффинные антитела), вероятно, захватывают толероген в первую очередь и поэтому предпочтительно становятся ареактивными. Это предположение хорошо согласуется с тем фактом, что даже незначительная индукция толерантности с помощью ДНФ-D-GL, обусловленная, как известно, клональной делецией В-клеток, выражается в заметном снижении образования высокоаффинных антител [352]. Отмена толерантности, индуцированной ДНФ-D-GL, возможно, начинается с образования низкоаффинных антител. Супрессорные Т-клетки имеют тенденцию предпочтительно подавлять образование высокоаффинных антител [353], и не исключено, что их активность является одним из факторов, ответственных за снижение аффинитета антител, продуцируемых частично толерантными животными [354]. Наконец, в нескольких системах было показано, что активность хелперных Т-клеток способствует отбору высокоаффинных антител [355]. Механизм этого явления полностью еще не изучен. Здесь могут играть определенную роль усиление пролиферации, идиотип-специфическая Т-клеточная регуляция и идиотип-антиидиотипические взаимодействия. Следует отметить, что индукция В-клеточной толерантности или специфическая активность супрессорных Т-клеток могут привести к глубокому снижению аффинитета антител даже при незначительном уменьшении величины ответа [356]. Напротив, средняя степень ареактивности Т-хелперов (или ограничение числа имеющихся Т-клеток), вероятно, оказывает слабое влияние (или почти не влияет) на аффинитет антител [356—358]. Прежде чем произойдет изменение аффинитета, необходимо гораздо более значительное уменьшение величины ответа. При достижении заметного подавления иммунного ответа падение аффинитета антител может быть таким же глубоким, как при В-клеточной толерантности или активности супрессорных Т-клеток; однако в большинстве случаев толерантность Т-хелперов практически не влияет на аффинитет антител. В необычной модели, где толерантность вызвана антителами, ареактивность связана с образованием небольшого количества антител с высоким аффинитетом [72].

Некоторые исследователи изучали свойства антител, которые продуцируются животными, иммунизируемыми во время спонтанного снятия толерантности. Эти антитела обладают ограниченной специфичностью; они реагируют с меньшим числом эпитопов, чем антитела нормальных животных [359]. Кроме того, находящиеся в периоде выхода из состояния толерантности животные продуцируют в основном IgM-антитела [83, 195].

20.3.4. Антигенсвязывающие клетки у толерантных животных

В многочисленных исследованиях была предпринята попытка выяснить, снижается ли у толерантных животных число антигенсвязывающих клеток (АСК). Полученные в этих исследованиях результаты были противоречивы: тогда как одни исследователи сообщают о снижении количества АСК [360—362], другие указывают на нормальное [363—368] или даже увеличенное число АСК [224—269]. Вероятно, эти различия в результатах отражают существова-

ние разных механизмов толерантности. Однако большинство исследователей не приводит никаких данных о точном механизме толерантности, что значительно затрудняет интерпретацию полученных результатов. Кроме того, методы, применяемые для определения АСК, могли оказывать существенное влияние на их выявление [370—374], что также затрудняет критический анализ результатов. Наконец, существует, по-видимому, большое число АСК с относительно низкой аффинностью, которые можно выявить только в условиях, оптимальных для анализа. Поэтому изменения среди высокоаффинных АСК в присутствии большого числа низкоаффинных АСК обнаружить трудно. Несмотря на эти сложности в интерпретации данных, создается впечатление, что состояние толерантности, вызванное чисто клональной делецией В-клеток, связано с уменьшением количества АСК. Другие типы толерантности могут быть связаны с уменьшенным, нормальным или увеличенным числом АСК в зависимости от определенных факторов, пока еще плохо поддающихся определению.

20.4. Механизмы толерантности

Очевидно, что экспериментально индуцированная иммунологическая толерантность не может быть обусловлена лишь каким-то одним механизмом. Толерантность может быть следствием определенных изменений в функциях различных клеточных популяций (Т- или В-клеток), а эти изменения в функциях в свою очередь могут быть вызваны самыми различными механизмами (такими, как активность супрессорных Т-клеток, клональная делеция, блокада рецепторов, конечная дифференцировка, блокада эффекторных клеток, антиидиотипические антитела). Помимо этих «центральных» механизмов толерантности, т. е. механизмов, непосредственно влияющих на функции специфических клеток, участвующих в генерации иммунного ответа, согласно имеющимся данным, существуют и другие, «периферические» механизмы, обуславливающие в некоторых системах видимое состояние ареактивности (это «перегрузка антигеном», сывороточные антитела). Такие «периферические» механизмы не оказывают прямого влияния на функции каких-либо типов клеток иммунной системы. От природы толерогена, деталей процедуры, используемой для индукции толерантности, и природы организма хозяина зависит, какой именно из данных механизмов оказывает действие. Однако точные причины, определяющие активацию того или иного механизма толерантности, недостаточно изучены, а данные по изучению специфических экспериментальных моделей с трудом поддаются обобщению.

В некоторых случаях состояние толерантности, по-видимому, опосредовано активностью механизмов, участвующих в нормальной регуляции иммунного ответа путем супрессии (down regulation), например, супрессорными Т-клетками и антиидиотипическими антителами). Другие механизмы, по-видимому, специфически направлены на опосредование толерантности и не участвуют в регуляции нормального иммунного ответа (клональное абортрование, обусловленное повышенной чувствительностью незрелых В-клеток к индукции толерантности и клональной делецией Т-хелперов). По-видимому, в отдельных экспериментальных условиях действуют и другие механизмы, участие которых в нормальных процессах толерантности к «своему» весьма сомнительно (это блокада рецепторов, блокада эффекторных клеток и толерантность к перегрузке антигеном).

20.4.1. Клональная делеция и клональное абортирование

Толерантность часто воспринимается как элиминация или постоянная эффективная инактивация специфических Т- или В-клеток в популяции периферических лимфоидных клеток. Вообще состояние толерантности считается следствием клональной делеции, если ареактивность сохраняется при переносе клеток от толерантного животного в среду, не содержащую антиген (перенос клеток в организм реципиента или в культуру ткани), и супрессорная активность не выявляется в экспериментах со смешиванием соответствующих клеток. Культивирование клеток толерантных животных с поликлональными активаторами В-клеток (ПВА) представляет собой дополнительный тест для выявления клональной делеции [375]. Если клетки не стимулируются к секреции антител, о которых идет речь, это свидетельствует о наличии клональной делеции. Явная легкость индукции толерантности у незрелых В-клеток, вероятно, имеет важное значение для индукции клонально-делеционной толерантности (которую называют также клональным абортированием, если незрелость В-клеток рассматривают в качестве принципиального фактора для индукции толерантности). Альтернативный механизм, с помощью которого достигается состояние клонально-делеционной толерантности, заключается в «истощающей терминальной дифференцировке». Было отмечено, что после оптимальной иммунизации некоторыми Т-независимыми антигенами при последующем разрешающем введении антигена может наблюдаться состояние ареактивности в отсутствие какой-либо выявляемой супрессорной активности (Говард и сотрудники). Таким образом, при некоторых обстоятельствах В-клетки, по-видимому, стимулируются к дифференцировке в плазматические клетки без сколько-нибудь заметного увеличения числа клеток памяти. Это приводит к функциональному состоянию толерантности, которое длится до тех пор, пока из клеток костного мозга не образуются новые реакционноспособные В-клетки.

20.4.2. Толерантность, опосредованная супрессорными Т-клетками

В многочисленных исследованиях, опубликованных сравнительно недавно, рассматривается роль супрессорных Т-клеток в регуляции нормального иммунного ответа и в осуществлении иммунологической толерантности. Описаны Т-клеточные регуляторные циклы, включающие в себя как антиген-специфические, так и идиотип-специфические Т-клетки. Очевидно, что, согласно множеству экспериментальных моделей, толерантность обусловлена активностью супрессорных Т-клеток. Высказывалось предположение, что такая активность может иметь важное значение при поддержании толерантности к «своему». Супрессорные клетки и супрессорные цепи обсуждаются в гл. 18.

20.4.3. Толерантность, опосредованная антителами

Существует предположение, что образование небольшого количества высокоаффинных антител после индуцирующего толерантность введения антигена может вызывать угнетение ответа на последующее введение антигена [72]. Очевидно, что пассивно введенные антитела будут специфически подавлять иммунный ответ, а высокоаффинные антитела окажутся в этом отношении более эффективными, чем низкоаффинные [289]. Отчасти механизм супрессии, вызванный антителами, несомненно, заключается в быстром выведении антигена; тем самым предотвращается стимуляция иммунного ответа. Возможно, стиму-

ляция антиидиотипических антител также способствует иммуносупрессивному эффекту пассивно введенных антител. Однако пока еще нет экспериментальных данных в пользу предположения о том, что сывороточные антитела, специфичные к антигену, играют важную роль в большинстве случаев иммунологической толерантности.

20.4.4. Толерантность при антигенных перегрузках

Согласно одной из наиболее ранних гипотез, рассматривающих иммунологическую толерантность, животные действительно продуцируют антитела, но все эти антитела связываются с антигеном, имеющимся в организме животного. Образующийся комплекс антиген—антитело подвергается фагоцитозу, и в сыворотке не остается свободных антител, которые можно было бы обнаружить. Согласно данным Говарда и его сотрудников, данный механизм действует по крайней мере временно, после введения высоких толерогенных доз полисахаридных антигенов. Однако трудно представить, чтобы этот механизм играл важную роль в толерантности, кроме исключительных случаев.

20.4.5. Блокада эффекторных клеток

Шрадер и Носсал [274—276] показали, что секреция антител В-клетками может быть прекращена перекрестным связыванием поверхностных антигенных рецепторов поливалентным антигеном. Подавление секреции является обратимым, и при расщеплении антигена подходящими ферментами секреция восстанавливается. Блокада эффекторных клеток, по-видимому, представляет собой механизм, способный угнетать функцию зрелых антителообразующих клеток; однако этот механизм толерантности, по-видимому, действует лишь в редких случаях.

20.4.6. Антиидиотипические антитела

Недавно было высказано предположение [376], что иммунная система действует как развитая сеть взаимосвязей идиотип—антиидиотип, которая в нормальных условиях существует в «равновесии» (или, более точно, в устойчивом состоянии). После введения антигена специфические клоны (несущие идиотипы) стимулируются к размножению, устойчивое состояние при этом нарушается, идиотип-специфические Т- и В-клетки стимулируются к пролиферации размножающимися идиотип-несущими клонами. В результате устойчивое состояние восстанавливается уже при новом соотношении клонов в системе. Эта сеть предположительно существует на уровне В-клеток, Т-клеток и сывороточных антител. Известно, что антиидиотипические антитела могут подавлять образование антител, несущих этот идиотип, и поэтому способны поддерживать состояние специфической толерантности. Антиидиотипические антитела могут специфически элиминировать клоны В-клеток, несущие идиотип [125, 126], а также специфически угнетать секрецию этого идиотипа зрелыми антителосекретирующими В-клетками [277—280]. Помимо этого, была доказана возможность образования идиотипспецифических Т-супрессоров (и Т-хелперов). Очевидно, что при некоторых состояниях иммунологической ареактивности активация идиотип-специфических супрессорных клеток и(или) аутоантиидиотипических антител служит механизмом регуляции иммунного ответа по принципу обратной связи [377—380]. Действие аутоантиидиотипических антител, по крайней мере у взрослых животных, по-видимому, не приводит к необратимой клональной делеции [377].

20.4.7. Блокада рецепторов

Были исследованы некоторые случаи толерантности, при которых состояние ареактивности легко снималось либо спонтанно после переноса клеток в среду, не содержащую антигена, либо после расщепления антигена, связанного с рецепторами клеточной поверхности. На основе весьма ограниченного числа данных был сделан вывод о том, что такая толерантность обусловлена связыванием значительной доли антигенных рецепторов с антигеном, с комплексом антиген—антитело или с антиидиотипическими антителами. Механизм, с помощью которого это связывание блокирует клеточные функции, не известен, и в какой степени это важно для возникновения толерантности, также не ясно.

20.4.8. Отсутствие контрсупрессии

Грин и др. [381] недавно показали, что для формирования иммунного ответа обязательно должны быть активированы Т-клетки, обладающие «контрсупрессорной активностью»; это позволяет Т-хелперам противостоять наблюдающемуся в норме регуляторному влиянию супрессорных клеток (*down regulation*). Аналогичную активность, названную *абросупрессией*, обнаружили Де-Крайфф и др. [382]. Грин и Гершон предположили, что толерантность может быть обусловлена снижением контрсупрессорной активности. В этих условиях супрессированное в норме состояние иммунной системы будет сохраняться и после введения антигена, Т-хелперы не будут активироваться и иммунного ответа не возникнет.

Заключение

Таким образом, в основе иммунологической толерантности может лежать множество различных механизмов. Это заключение, по-видимому, справедливо в отношении толерантности и к неживым антигенам, и к живым клеткам (трансплантационная толерантность) [384]. В некоторых случаях эти механизмы, вероятно, являются нормальными регуляторными механизмами, которые у толерантного животного имеют тенденцию к необычно выраженному супрессирующему эффекту (*down regulation*) (например, супрессорные Т-клетки, антиидиотипические антитела, идиотип-антиидиотипическая сеть). В других случаях данные механизмы возникли, по-видимому, специально для поддержания состояния ареактивности, возможно, для поддержания толерантности «к своему» (например, клональное абортрование, супрессорные Т-клетки). Наконец, описано несколько механизмов специфической депрессии иммунного ответа, которые, возможно, действуют исключительно в специфических экспериментальных условиях (например, антиген-специфические антитела, блокада эффекторных клеток, толерантность при антигенных перегрузках, блокада рецепторов). Описано множество специфических супрессорных механизмов (*down regulation*), которые могут независимо или совместно отвечать за состояние иммунологической толерантности.

Что касается взаимосвязи между рассмотренными выше механизмами экспериментально индуцированной толерантности и механизмом или механизмами нормальной ареактивности к компонентам собственной ткани (естественная толерантность к «своему»), то тут только можно строить предположения, поскольку имеющиеся данные весьма ограничены. Кажется очевидным, что толерантность к «своему» не должна распространяться на все тканевые компоненты. Так, отсутствие в организме иммунного ответа на определенные компоненты

глаза, мозга и семенников, по-видимому, отражает не состояние толерантности, а нормальную изоляцию ткани от иммунной системы хозяина. При разрушении обычных анатомических барьеров аутоиммунный ответ легко формируется. Для собственных компонентов, постоянно экспонированных иммунной системе, несомненно, существует состояние толерантности, хотя механизм его не известен. Выявление В-клеток, специфичных к некоторым аутоантигенам, таким, как тиреоглобулин, привело к предположению, что возникновение естественной ареактивности связано с толерантностью Т-хелперов. Однако толерантность, обусловленная Т-хелперами, может быть легко отменена перекрестно реагирующими антигенами, поликлональными активаторами В-клеток или факторами, способными активировать В-клетки в отсутствие Т-хелперов. Таким образом, чисто Т-клеточная толерантность является, очевидно, относительно нестабильным механизмом для поддержания длительного состояния толерантности к «своему». Поэтому считается, что потере способности реагировать на собственные антигены способствуют также активные супрессорные механизмы, такие, как Т-супрессоры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frey J. R., de Weck A. L., Geleick H. *Int. Arch. Allergy*, **30**, 521 (1966).
2. Phanuphak P., Moorhead J. W., Claman H. N. *J. Immunol.*, **114**, 1147 (1975).
3. Dwyer J. M., Kantor F. S. *J. Exp. Med.*, **137**, 32 (1973).
4. Levin H. A., Levin H., Schlossman S. F. *J. Exp. Med.*, **133**, 1199 (1971).
5. Polak L., Ryden A., Roelents G. E. *Immunology*, **28**, 479 (1975).
6. Wells H. G., Osborne T. B., *J. Infect. Dis.* **8**, 66 (1911).
7. Glenny A. T., Hopkins B. E. *J. Hyg. (Lond)*, **22**, 208 (1963).
8. Sulzberger M. B. *Arch. Dermatol. Syphilol.*, **20**, 669 (1929).
9. Sulzberger M. B., *Arch. Dermatol. Syphilol.*, **22**, 839 (1930).
10. Chase M. W. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **61**, 257 (1946).
11. Chase M. W., Battisto J. R. In: *Mechanisms of Hypersensitivity*, ed. J. H. Shaffer, G. A. Lo Grippo, and M. W. Chase, p. 507. Little-Brown, Boston, 1959.
12. Chase M. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **392**, 228 (1982).
13. Felton L. D., Kauffmann G., Prescott B., Ottinger B. *J. Immunol.*, **74**, 17 (1955).
14. Kaplan M. H., Coons A. H., Deane H. W. *J. Exp. Med.*, **91**, 15 (1950).
15. Stark O. K. *Bact. Proc.*, p. 64, 1954.
16. Dixon F. G., Maurer P. H., Weigle W. O. *J. Immunol.*, **74**, 188 (1955).
17. Owen R. D. *Nature*, **102**, 400 (1945).
18. Owen R. D. *J. Hered.*, **37**, 291 (1946).
19. Burnet F. M., Fenner F. In: *The Production of Antibodies*, Macmillan Co., Melbourne, 1949.
20. Billingham R. E., Brent L., Medewar P. B. *Nature*, **12**, 602 (1953).
21. Billingham R. E., Brent L., Medewar P. B. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]*, **239**, 357 (1956).
22. Hasek M. *Cesk Biol.*, **2**, 267 (1953).
23. Hasek M. *Cesk. Biol.*, **3**, 344 (1954).
24. Hasek M., Hrabá T. *Nature*, **175**, 764 (1955).
25. Hanan R., Oyma J. *J. Immunol.*, **73**, 49 (1954).
26. Dixon F. J., Maurer P. H. *J. Exp. Med.*, **101**, 245 (1955).
27. Simonsen M. *Nature*, **175**, 763 (1955).
28. Weigle W. O., Dixon F. J. In: *Mechanisms of Hypersensitivity*, ed. by J. H. Shaffer, G. A. Lo Grippo, and M. W. Chase, p. 529. Little-Brown, Boston, 1959.
29. Smith R. T., Bridges R. A. *J. Exp. Med.*, **108**, 227 (1958).
30. Howard J. G., Mitchison N. A. *Prog. Allergy*, **18**, 43. (1975).
31. Kawaguchi S. *Immunology*, **19**, 277 (1970).
32. Siskind G. W., Howard J. H. *J. Exp. Med.*, **124**, 417 (1966).
33. Sercarz E., Coons A. H. *Nature*, **184**, 1080 (1959).
34. Dresser D. W. *Immunology*, **5**, 161 (1962).
35. Eitzman D. V. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 529 (1959).
36. Johnson A. G., Watson D. W., Cromartie W. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 421 (1955).
37. Sercarz E. E., Coons A. H. *J. Immunol.*, **90**, 478 (1963).

38. *Mitchison N. A.* Proc. R. Soc. Lond. [Biol.], **161**, 275 (1964).
39. *Weigle W. O.* Clin. Exp. Immunol., **9**, 437 (1971).
40. *Mitchison N. A.* Immunology, **15**, 531 (1968).
41. *Shellam G. R.* Immunology, **16**, 45 (1969).
42. *Golub E. S., Weigle W. O.* J. Immunol., **102**, 389 (1969).
43. *Coe J. E., Salvin S. B.* J. Exp. Med., **117**, 401 (1963).
44. *Battisto J. R., Miller J.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **111**, 111 (1962).
45. *Thomas H. C., Parrot M. V.* Immunology, **27**, 631 (1974).
46. *André C., Heremans J. F., Vaerman J. P., Combiasso C. L.* J. Exp. Med., **142**, 1509 (1975).
47. *Asherson G. L., Zembala M., Perera M. A. C. C., Mayhew B., Thomas W. R.* Cell Immunol., **33**, 145 (1977).
48. *Kagnoff M. E.* J. Immunol., **120**, 1509 (1978).
49. *Richman L. K., Chiller J. M., Brown W. R., Hanson D. G., Vaz N. M.* J. Immunol., **121**, 2429 (1978).
50. *Hanson D. G., Vaz N. M., Rawlings L. A., Lynch J. M.* J. Immunol., **122**, 2261 (1979).
51. *Mattingly J. A., Waksman B. H.* J. Immunol., **125**, 1044 (1980).
52. *Mattingly J. A., Kaplan J. M., Janeway C. A. Jr.* J. Exp. Med., **152**, 545 (1980).
53. *Challacombe S. J., Tomasi T. B., Jr.* J. Exp. Med., **152**, 1459 (1980).
54. *Mottram P. L., Miller J. F. A.* Eur. J. Immunol., **10**, 165 (1980).
55. *Ptak W., Rozychka D., Askenase P. W., Gershon R. K.* J. Exp. Med., **151**, 362 (1980).
56. *Claman H. N., Miller S. D., Moorhead J. W.* In: Immunologic Tolerance and Macrophage Function, ed. by J. F. Baram, J. R. Battisto, and C. W. Pierce, pp. 223—243. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1979.
57. *Polak L.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **392**, 90 (1982).
58. *Horiuchi A., Waksman B. H.* J. Immunol., **101**, 1322 (1968).
59. *Horiuchi A., Waksman B. H.* J. Immunol., **100**, 974 (1968).
60. *Janeway C. A., Sela M.* Immunology, **13**, 29 (1967).
61. *Sitnick V. B.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **181**, 196 (1971).
62. *Hotchin J., Benson L. M., Seamer J.* Virology, **18**, 71 (1962).
63. *Rubin H., Fanshier L., Cornelius A., Hughes W. F.* Virology, **17**, 143 (1962).
64. *Volkert M., Lundstedt C.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **181**, 183 (1971).
65. *Dresser D. W.* Nature, **191**, 1169 (1961).
66. *Dresser D. W.* Immunology, **4**, 13. (1961).
67. *Dresser D. W.* Immunology, **5**, 378 (1962).
68. *Dresser D. W.* Immunology, **6**, 345 (1963).
69. *Dresser D. W.* Immunology, **9**, 261 (1965).
70. *Chiller J. M., Habicht G. S., Weigle W. O.* Nature, **171**, 813 (1971).
71. *Chiller J. M., Weigle W. O.* J. Immunol., **106**, 1647 (1971).
72. *Dresser D. W., Gowland G.* Nature, **203**, 733 (1964).
73. *Biro C. E., Garcia G.* Immunology, **8**, 411. (1965).
74. *Claman H. N.* J. Immunol., **91**, 833. (1963).
75. *Dietrich F. M., Weigle W. O.* J. Immunol., **92**, 167 (1964).
76. *Frei P. C., Cruchaud S., Arnaudo L., Vannotti A. J.* Immunol., **101**, 605 (1968).
77. *Frei P. C., Benacorra B., Thorbecke G. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **53**, 20 (1965).
78. *Geyere J. W., Kong Y. M.* Cell. Immunol., **13**, 447 (1974).
79. *Dvorak H. F., Simpson B. A., Bast R. C. J.* Immunol., **102**, 1163. (1969).
80. *Birnbaum G., Weksler M. E., Siskind G. W.* J. Exp. Med., **141**, 411 (1975).
81. *Howard H. G., Siskind G. W.* Clin. Exp. Immunol., **4**, 29 (1969).
82. *Nossal G. J. V., Ada G. L., Austin C. M.* J. Immunol., **95**, 665 (1965).
83. *Parish C. R., Ada G. L.* Nature, **17**, 153 (1969).
84. *Ada G. L., Parish C. R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61**, 556. (1978).
85. *Ada G. L., Parish C. R., Nossal G. J. V., Abbot A.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **32**, 381 (1967).
86. *Miranda J. J., Zola H., Howard J. G.*, Immunology, **23**, 843 (1972).
87. *Moreno C., Hale C.* Eur. J. Immunol., **6**, 773 (1976).
88. *Howard J. G., Zola H.* Immunology, **21**, 535 (1974).
89. *Anderson B. J.* Immunol., **102**, 1309 (1969).
90. *Fidler J. M., Golub E. S.* J. Exp. Med., **137**, 42 (1973).
91. *Gronowicz E., Coutinho A., Sjöberg O.* Eur. J. Immunol., **4**, 226 (1974).
92. *de Weck A. L., Girard J. P.* Int. Arch. Allergy, **42**, 798 (1972).
93. *Jones V. E., Leskowitz S. J.* Exp. Med., **122**, 505 (1965).
94. *Leskowitz S.* Immunology, **13**, 9 (1967).
95. *Feldmann M. J.* Exp. Med., **135**, 735 (1972).
96. *Desaymard C., Feldmann M.* Eur. J. Immunol., **5**, 537 (1975).
97. *Desaymard C., Howard J. G.* Eur. J. Immunol., **5**, 541 (1975).

98. Feldman M., Howard J. G., Desaymard C. *Transplant. Rev.*, **23**, 78 (1975).
99. Hamilton J. A., Miller J. F. A. P. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 261 (1974).
100. Parish C. R. J. *Exp. Med.*, **134**, 1 (1971).
101. Parish C. R. J. *Exp. Med.*, **134**, 21 (1971).
102. Parish C. R. *Cell. Immunol.*, **6**, 66 (1973).
103. Parish C. R., Liew F. Y. J. *Exp. Med.*, **135**, 298 (1972).
104. Ishizaka K., Okudaira H., King T. P. J. *Immunol.*, **114**, 110 (1975).
105. Takatsu K., Ishizaka K., *Cell. Immunol.*, **20**, 276 (1975).
106. Bach M. K., Brashler J. R. J. *Immunol.*, **114**, 1499 (1975).
107. Cinader B., Dubert J. M. *Br. J. Exp. Pathol.*, **36**, 515 (1955).
108. Mitchison N. A. *Immunology*, **5**, 341 (1962).
109. Nossal G. J. V. *Aus. J. Exp. Biol.*, **36**, 235 (1958).
110. Cohen M. W., Thorbecke G. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **112**, 10 (1963).
111. Friedman H. J. *Immunol.*, **94**, 205 (1965).
112. Siskind G. W., Paterson P. Y., Thomas L. J. *Immunol.*, **90**, 929 (1963).
113. Thorbecke G. J., Siskind G. W., Goldberger N. J. *Immunology*, **87**, 147 (1961).
114. Terres G., Hughes M. L. J. *Immunol.*, **83**, 459 (1959).
115. Silverstein A. M., Uhr J. W., Kraner K. L. J. *Exp. Med.*, **117**, 799 (1963).
116. Howard J. G., Michie J. *Transplant. Bull.*, **29**, 1 (1962).
117. Nossal G. J. V., Pike B. L. J. *Exp. Med.*, **141**, 904 (1975).
118. Metcalf E. S., Klinman N. R. J. *Exp. Med.*, **143**, 1327 (1976).
119. Cambier J. C., Kettman J. R., Vitetta E. S., Uhr J. W. J. *Exp. Med.*, **144**, 293 (1976).
120. Szewczuk M. R., Siskind G. W. J. *Exp. Med.*, **145**, 1590 (1977).
121. Sidman C. L., Unanue E. R. *Nature*, **257**, 149 (1975).
122. Raff M. D., Owen J. T., Cooper A. R., Lawton A. R., III, Megson M., Gathings W. E. J. *Exp. Med.*, **142**, 1052 (1975).
123. Chen Y. W., Siskind G. W. *Cell. Immunol.*, **77**, 99—108 (1983).
124. Chen Y. W., Jacobson E., Siskind G. W. (submitted for publication).
125. Strayer D. S., Cosenza H., Lee W. M. F., Rowley D. A., Köhler H. *Science*, **186**, 640 (1974).
126. Köhler H., Kaplan D. R., Strayer D. S. *Science*, **186**, 643 (1974).
127. Hart D. A., Pawlak L. L., Nisonoff A. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 44 (1973).
128. Pawlak L. L., Hart D. A., Nisonoff A. J. *Exp. Med.*, **137**, 1442 (1973).
129. Strayer D. S., Lee W. M. F., Rowley D. A., Köhler H. J. *Immunol.*, **114**, 728 (1975).
130. Diener E., Eienner U. A., vonBorstel R. C., Waters C. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **392**, 35 (1982).
131. Mosier D. E., Johnson B. M. J. *Exp. Med.*, **144**, 216 (1975).
132. Howard J. G., Hale C. *Eur. J. Immunol.*, **6**, 486 (1976).
133. Parks D. E., Nelson P. A., Walker S. M., Weigle W. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **392**, 210 (1982).
134. Friedman H. J. *Immunol.*, **94**, 205 (1965).
135. Katz D. H. In: *Immunological Tolerance, Mechanisms and Potential Therapeutic Applications*, ed. by D. H. Katz and B. Benacerraf, p. 189, Academic Press, New York, 1974.
136. Katz D. H., Benacerraf B. In: *Immunological Tolerance, Mechanisms and Potential Therapeutic Applications*, ed. by D. H. Katz and B. Benacerraf, p. 198. Academic Press, New York, 1974.
137. Lee W. Y., Sehon A. H. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **49**, 222 (1975).
138. Lee W. Y., Sehon A. H. J. *Immunol.*, **114**, 829 (1975).
139. Lee W. Y., Sehon A. H. J. *Immunol.*, **114**, 837 (1975).
140. Hamilton J. A., Miller J. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 261 (1974).
141. Ishizaka K., Okudaira H., King T. P. J. *Immunol.*, **114**, 110 (1975).
142. Bach M. K., Brashler J. R. J. *Immunol.*, **114**, 1799 (1975).
143. Roelants G. W., Goodman J. W. *Nature*, **227**, 175 (1970).
144. Schechter I., Bauminger S., Sela M. *Biochem. Biophys. Acta*, **93**, 686 (1964).
145. Golan D. T., Borel Y. J. *Exp. Med.*, **134**, 1046 (1971).
146. Lee W. Y., Sehon A. H. *Nature*, **267**, 618 (1977).
147. Lee W. Y., Sehon A. H. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **56**, 193 (1978).
148. Hubbard D. A., Lee W. Y., Sehon A. H. J. *Immunol.*, **126**, 407. (1981).
149. Lee W. Y., Sehon A. H. J. *Immunol.*, **126**, 414 (1981).
150. Lee W. Y., Hubbard D. A., Cripps V., Sehon A. H. *Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.*, **63**, 1 (1980).
151. Janeway C. A., Sela M. *Immunology*, **13**, 29 (1967).
152. Mitchell G. F., Humphrey J. H., Williamson A. R. *Eur. J. Immunol.*, **2**, 460 (1972).
153. Katz A. H., Davie J. M., Paul W. E., Benacerraf B. J. *Exp. Med.*, **134**, 201 (1971).
154. Nossal G. J. V., Pike B. L., Katz D. H. J. *Exp. Med.*, **138**, 312 (1973).
155. Katz D. H., Hamoaka T., Benacerraf B. J. *Exp. Med.*, **136**, 1404 (1972).

156. Katz D. H., Hamoaka T., Benacerraf B. J. Exp. Med., 139, 1464 (1974).
157. Eshhar E., Benacerraf B., Katz D. J. Immunol., 114, 872 (1975).
158. Katz D. H., Hamoaka T., Benacerraf B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2776 (1973).
159. Havas H. F. Immunology, 17, 819 (1969).
160. Borel Y. Nature, 230, 180 (1971).
161. Benson A.-B., Borel Y. J. Immunol., 112, 1793 (1974).
162. Walters C. S., Moorhead J. W., Claman H. N. J. Exp. Med., 136, 546 (1972).
163. Borel Y., Kilham L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145, 470 (1974).
164. Stollar B. D., Borel Y., J. Immunol., 115, 1095 (1975).
165. Battista J. R., Bloom B. R. Nature, 212, 156 (1966).
166. Naor D., Morecki S., Mitchell G. F. Eur. J. Immunol., 4, 311 (1974).
167. Naor D., Mischell R. J. Immunol., 108, 246 (1972).
168. Scott D. W. Cell. Immunol., 37, 327 (1978).
169. Jandinski J. J., Scott D. W. J. Immunol., 123, 2447. (1979).
170. Batisto J. R., Bloom B. R. Nature, 212, 156 (1966).
171. Miller S. D., Sy M. S., Claman H. N. Eur. J. Immunol., 7, 165 (1977).
172. Miller S. D., Wetzig R. F., Claman H. N., J. Exp. Med., 149, 758 (1979).
173. Sherr D. H., Cheung N. K., Heghinton B., Benacerraf B., Dorf M. E. J. Immunol., 122, 1899 (1979).
174. Braley-Mullen H., Cell. Immunol., 52, 132 (1980).
175. Fraser V., Braley-Mullen H. Cell. Immunol., 63, 177 (1981).
176. Borel Y. Transplant. Rev. 31, 3 (1976).
177. Paley R. S., Leskowitz S., Borel Y. J. Immunol., 115, 1409 (1975).
178. Shearer G. M. Eur. J. Immunol., 4, 527 (1974).
179. Shearer G. M., Rehn T. G., Garbarino C. A. J. Exp. Med., 141, 1348 (1975).
180. Scott D. W., Long C., Jandinski J. J., James T. C. Immunol. Rev., 50, 275 (1980).
181. Green M. I., Benacerraf B. Immunol. Rev., 50, 163 (1980).
182. Morrhead J. W. J. Exp. Med., 150, 1432 (1979).
183. Claman H. N., Miller S. D., Sy M.-S. J. Exp. Med., 146, 49 (1977).
184. Scott D. W., Darrow T. L., Grouiz B. Ann. N. Y. Acad. Sci., 392, 1 (1982).
185. Schwartz R., Dameshek W. Nature, 100, 1002 (1959).
186. Nachtigal D., Feldman M. Immunology, 6, 356 (1963).
187. Sterzl J. Nature, 189, 1022 (1961).
188. Gordon R. O., Wade M. E., Mitchell M. S. J. Immunol 94, 682 (1965).
189. Nakamura R. M., Weigle W. O. Clin. Exp. Immunol., 7, 541 (1970).
190. Maquire H. C., Maibach H. I. J. Allergy, 32, 406 (1971).
191. Nakamura R. M., Weigle W. O. Clin. Exp. Immunol., 7, 541 (1970).
192. Gordon R. O., Wade M. E., Mitchell M. S. J. Immunol., 103, 233 (1969).
193. Many A., Schwartz R. S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 754 (1970).
194. Miller J. F. A. P., Mitchell G. F. J. Exp. Med., 131, 675 (1970).
195. Aisenberg A. C., Davis C. J. Exp. Med., 128, 35 (1968).
196. Howard J. G., Courtenay B. M. Eur. J. Immunol., 4, 603 (1974).
197. Many A., Schwartz R. S. Clin. Exp. Immunol., 6, 87 (1970).
198. Aisenberg A. C. J. Exp. Med., 125, 833 (1967).
199. Salvin S. B., Smith R. F. J. Exp. Med., 119, 851 (1964).
200. Shellam G. R. Immunology, 17, 267 (1969).
201. Nachtigal D., Greenberg E., Feldman M. Immunology, 15, 343 (1968).
202. Rittenberg M., Nelson E. L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 101 (1963).
203. Linscott W. D., Weigle W. O. J. Immunol., 94, 430 (1965).
204. Kawaguchi S. Immunology, 19, 277 (1970).
205. Weigle W. O., High G. J. J. Immunol., 99, 392 (1967).
206. Kawaguchi Y. Immunology, 19, 277 (1970).
207. Shellam G. R. Immunology, 17, 267 (1969).
208. Zan-Bar I., Nachtigal D., Feldman M. Cell. Immunol., 17, 215 (1975).
209. Dukor P., Dietrich F. M. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 280 (1970).
210. Weissman I. L., J. Exp. Med., 137, 504 (1973).
211. Blomgren H., Anderson B. Exp. Cell. Res., 57, 185 (1969).
212. Chase M. W. Ann. Rev. Microbiol., 13, 349 (1959).
213. Sulzberger M. B. Arch. Derm. Syphilol., 20, 669 (1929).
214. Frey J. R., Deweck A. L., Geleick H. J. Invest. Dermatol., 42, 41 (1964).
215. Fidler I. J., Golub E. S. J. Immunol., 111, 317 (1973).
216. Frey J. R., Deweck A. L., Geleick H. Clin. Exp. Immunol., 8, 131 (1971).
217. Frey J. R., de Weck A. L., Geleick H., Polak L. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 42, 278 (1972).
218. Gronowicz E., Coutinho A., Sjöberg O. Eur. J. Immunol., 4, 226 (1974).

219. Zembala M., Asherson G. L. *Nature*, **244**, 227 (1973).
220. Dresser D. W. *Int. Arch. Allergy*, **35**, 253 (1969).
221. Das S., DiPadua D., Leskowitz S. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **144**, 373 (1973).
222. Kong Y. L. M., Wiger D. L. *J. Immunol.*, **105**, 370 (1970).
223. Das S., Leskowitz S. *J. Immunol.*, **105**, 938 (1970).
224. Lukic M. L., Cowing C., Leskowitz S. *J. Immunol.*, **114**, 503 (1975).
225. Das S., Leskowitz S. *J. Immunol.*, **112**, 107 (1974).
226. Staples P. J., Talal N. *J. Exp. Med.*, **129**, 123 (1969).
227. Matangkasombut P., Seastone C. V. *J. Immunol.*, **100**, 845. (1968).
228. Golub E. S., Weigle W. O. *J. Immunol.*, **99**, 624 (1967).
229. Chiller J. M., Weigle W. O. *J. Immunol.*, **106**, 1647 (1971).
230. Chiller J. M., Weigle W. O. *Cont. Top. Immunobiol.*, **1**, 119 (1972).
231. Chiller J. M., Habicht G. S., Weigle W. O. *Science*, **171**, 813 (1971).
232. Chiller J. M., Weigle W. O. *J. Immunol.*, **110**, 1051 (1973).
233. Sciubenski R., Sercarz E. *J. Immunol.*, **110**, 540 (1973).
234. Miranda J. J., Zola H., Howard J. G. *Immunology*, **23**, 843 (1972).
235. Britton S. J. *Exp. Med.*, **129**, 469 (1969).
236. Diener E., Feldmann M. *Transplant. Rev.* **8**, 76 (1972).
237. Kotlarski I., Courtenay B. M., Howard J. G. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 496 (1973).
238. Feldmann M. *Nature*, **231**, 21 (1971).
239. Rowley D. A., Fitch F. W. *J. Exp. Med.*, **121**, 683 (1965).
240. Howard J. G., Elson J., Christie G. H., Kinsky R. G. *Clin. Exp. Immunol.*, **4**, 41 (1969).
241. Howard J. G., Christie G. H., Courtenay B. M. *Transplantation*, **10**, 351 (1970).
242. Kerman R., Segre D., Myers W. L., *J. Immunol.*, **104**, 656 (1970).
243. Brent L., Gowland G. *Nature*, **196**, 1298 (1962).
244. Brent L., Gowland G. *Transplantation*, **1**, 372 (1969).
245. Nossal G. J. V. Austin C. M. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **44**, 327 (1966).
246. Sterzl S., Trinka Z. *Nature*, **179**, 918 (1957).
247. Sterzl J. *Nature*, **209**, 416 (1966).
248. Feldmann M. B., Diener E. *J. Exp. Med.*, **131**, 247 (1970).
249. Diener E., Feldmann M. *J. Exp. Med.*, **132**, 31 (1970).
250. Diener G., Armstrong W. D. *J. Exp. Med.*, **129**, 591 (1967).
251. Diener E., Armstrong W. D. *Lancet*, **2**, 1281 (1967).
252. Schaefer A. E., Adler C. T., Fishman M. *J. Immunol.*, **114**, 1281 (1975).
253. Kotlarski I., Courtenay B. M., Howard J. G. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 496 (1973).
254. Kettman J. *J. Immunol.*, **112**, 1139 (1974).
255. Kettman J., Lesley J. *Cell. Immunol.*, **17**, 1 (1975).
256. Feldman M. *Nature*, **231**, 21 (1971).
257. Feldmann M., Diener E. *Nature*, **231**, 183 (1971).
258. Britton S. J. *Exp. Med.*, **129**, 469. (1969).
259. Smith R. T. In: *Mechanisms of Antibody Formation*, ed. by M. Holub and J. Jaroskova, pp. 313—328, Academic Press, New York, 1960.
260. Mitchison N. A. In: *Biological Problems of Grafting*, ed by F. Albert and P. B. Medawar, pp. 239—259, Blackwell, Oxford, 1959.
261. Boyse E. A., Carswell E. A., Scheid M. P., Old L. J. *Nature* **244**, 441 (1973).
262. Boyse E. A., Lance E. M., Carswell E. A., Cooper S., Old L. J. *Nature*, **227**, 901 (1970).
263. Lance E. M., Boyse E. A., Cooper S., Carswell E. A. *Transplant. Proc.*, **3**, 864 (1971).
264. Humphrey J. H. *Immunology*, **7**, 449 (1964).
265. Mitchison N. A. *Immunology*, **5**, 359 (1962).
266. Mitchell J., Nossal G. J. V. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **44**, 211 (1966).
267. Dietrich F. M., Weigle W. O. *J. Exp. Med.*, **117**, 621 (1963).
268. Möller E., Sjöberg O. *Transplant. Rev.* **8**, 26 (1972).
269. Sjöberg O. *J. Exp. Med.*, **135**, 850 (1972).
270. McGregor D. D., McCullagh P. J., Gowans J. L. *Proc. R. Soc. Lond [Biol.]*, **168**, 229 (1967).
271. Byers V. S., Sercarz E. E. *J. Exp. Med.*, **132**, 845 (1970).
272. Stacker J. W., Nossal G. J. V. *Cell. Immunol.*, **16**, 162. (1975).
273. Gronowicz E., Coutinho A., Sjöberg O. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 771 (1974).
274. Nossal G. J. V. *Adv. Cancer Res.*, **20**, 93 (1974).
275. Schrader J. W., Nossal G. J. V. *J. Exp. Med.*, **139**, 1582 (1974).
276. Schrader J. W. *Eur. J. Immunol.*, **5**, 808 (1975).
277. Schrader A. F., Goidl E. A., Thorbecke G. J., Siskind G. W. *J. Exp. Med.*, **150**, 138 (1979).
278. Goidl E. A., Schrader A. F., Siskind G. W., Thorbecke G. J. *J. Exp. Med.*, **150**, 154 (1979).
279. Schrader A. F., Goidl E. A., Thorbecke G. J., Siskind G. W. *J. Exp. Med.*, **150**, 808 (1979).
280. Goidl E. A., Schrader A. F., Thorbecke G. J., Siskind G. W. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 810 (1980).
281. Dresser D. W. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **35**, 253 (1969).

282. *Mitchison N. A.* Immunology, 9, 129 (1965).
283. *Claman H. N., Talmage D. W.* Science, 141, 1193 (1963).
284. *Taylor R. B.* Immunology, 7, 595 (1964).
285. *Howard J. G., Christie J. H., Courtenay B. M., Leuchars E., Davies A. J. S.* Cell. Immunol., 2, 614 (1971).
286. *Sercarz E. E., Coons A. H. J.* Immunol., 90, 478 (1963).
287. *Chiller J. M., Weigle W. O. J.* Exp. Med., 137, 740 (1973).
288. *Siskind G. W., Eisen H. N. J.* Immunol., 95, 436 (1965).
289. *Siskind G. W., Dunn P., Walker J. G. J.* Exp. Med., 127, 55 (1968).
290. *Werblin T., Siskind G. W.* Transplant. Rev. 8, 104 (1972).
291. *Werblin T. P., Kim Y. T., Quagliata F., Siskind G. W.* Immunology, 24, 477 (1973).
292. *Yung L. L., Wyn-Evans T. C., Diener E.* Eur. J. Immunol., 3, 224 (1973).
293. *Nossal G. J. V., Pike B. L.* Immunology, 25, 33 (1973).
294. *Billingham R. E., Silvers W.* Transplant. Bull., 28, 113 (1961).
295. *Szenberg A., Warner N. L.* Nature, 198, 1012 (1963).
296. *Argyris B. F.* Transplantation, 3, 350 (1965).
297. *McCullagh P. J.* Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48, 351 (1970).
298. *McCullagh P. J.* Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48, 369 (1970).
299. *Polak L. J.* Immunol., 114, 988 (1975).
300. *Zolla S., Naor D. J.* Exp. Med., 140, 1421 (1970).
301. *Tempelis C. H., Wolfe H. R., Mueller A.* Br. J. Exp. Pathol., 39, 323 (1958).
302. *Weigle W. O. J.* Immunol., 92, 113 (1964).
303. *Nossal G. J. V., Larkin M. E.* Aust. J. Sci., 22, 168 (1959).
304. *Brooke M. S.* Nature, 204, 1319 (1964).
305. *Brooke M. S. J.* Immunol., 96, 364 (1966).
306. *Lind P. E.* Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 46, 179 (1968).
307. *Claman H. N. J.* Immunol., 91, 833 (1963).
308. *Golub E. S., Weigle W. O. J.* Immunol., 98, 1241 (1967).
309. *Katz D. H.* Transplant. Rev. 12, 141 (1972).
310. *Schimpl A., Wecker E.* Nature, 237, 15 (1972).
311. *McCullagh P. J. J.* Exp. Med., 132, 916 (1970).
312. *Nachtigal D., Zan-Bar I.* Eur. J. Immunol., 3, 315 (1973).
313. *Bouvet H., Amstutz H., Liacopoulos P.* Cell. Immunol., 17, 114 (1975).
314. *Polak L.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 49, 281 (1975).
315. *Polak L.* Clin. Exp. Immunol., 19, 543 (1975).
316. *Turk J. L., Parker D., Poulter L. W.* Immunology, 23, 493 (1972).
317. *Mäkelä O., Nossal G. J. V. J.* Immunol., 88, 613 (1962).
318. *Stone W. H., Owen R. D.* Transplantation, 1, 107 (1963).
319. *Fefer A., Nossal G. J. V.* Plast. Reconstr. Surg. 29, 445 (1962).
320. *Weigle W. O.* In: Monographs in Microbiology, ed. by C. K. Williamson, World Publishing, Cleveland, Ohio, 1969.
321. *Denhardt D. T., Owen R. D.* Transplant. Bull., 7, 394 (1960).
322. *Claman H. N., McDonald W.* Nature, 202, 712 (1964).
323. *Cinader B., Dubert J. M.* Br. J. Exp. Pathol., 36, 515 (1955).
324. *Schechter I., Bauminger S., Sela M., Nachtigal D., Feldman M.* Immunochemistry, 1, 249 (1964).
325. *Nachtigal D., Feldmann M.* Immunology, 7, 616. (1964).
326. *Dietrich F. M. J.* Immunol., 97, 216 (1966).
327. *Nachtigal D., Eschel-Zussman R., Feldmann M.* Immunology, 9, 543 (1965).
328. *Paul W. E., Siskind G. W., Benacerraf B.* Immunology, 13, 147 (1967).
329. *Cinader B., Dubert J. M.* Proc. R. Soc. Lond. [Biol.], 146, 18 (1957).
330. *Yoshimura M., Cinader B. J.* Immunol., 97, 959 (1966).
331. *Hraba T., Karakoz I., Madar J.* Folia Biol. (Praha), 24, 206 (1978).
332. *Karakoz I., Madar J., Hraba T.* Folia Biol. (Praha), 25, 349 (1979).
333. *Weigle W. O. J.* Exp. Med., 116, 913 (1962).
334. *Weigle W. O. J.* Immunol., 92, 791 (1964).
335. *Weigle W. O.* Immunology, 7, 239 (1964).
336. *Weigle W. O.* Adv. Immunol., 16, 61 (1973).
337. *Weigle W. O. J.* Exp. Med., 114, 111 (1961).
338. *Weigle W. O. J.* Exp. Med., 121, 289 (1965).
339. *Weigle W. O. J.* Immunol., 94, 177 (1965).
340. *Fujuwara M.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 48, 429 (1975).
341. *Fujuwara M., Fujuwara S.* Immunology, 29, 1171 (1975).
342. *Benjamin D. C., Weigle W. O. J.* Exp. Med., 132, 66 (1970).
343. *Linscott W. D., Weigle W. O. J.* Immunol., 95, 546 (1965).

344. Habicht G., Chiller J., Weigle W. O. Fed. Proc., 31, 773 (1972).
345. Intini C., Segre D., Segre M., Myers W. L. J. Immunol., 107, 1014 (1971).
346. Azaz M. M. J. Immunol., 97, 445 (1966).
347. Biro C. E., Irroyave C. Immunology, 18, 387 (1970).
348. Benjamin D. C., Weigle W. O. J. Exp. Med., 132, 66 (1970).
349. Theis G. A., Siskind G. W. J. Immunol., 100, 138 (1968).
350. Andersson B., Weigzell H. Eur. J. Immunol., 1, 384 (1971).
351. Bell E. B. Eur. J. Immunol., 3, 267 (1973).
352. Davie J. M., Paul W. E., Katz D. H., Benacerraf B. J. Exp. Med., 136, 426 (1972).
353. Takemori T., Tada T. J. Exp. Med., 140, 253 (1974).
354. Bell E. B., Shand F. L. Eur. J. Immunol., 5, 481 (1975).
355. Gershon R. K., Paul W. E. J. Immunol., 106, 872 (1971).
356. Andersson B., Celada F., Asjo B. Eur. J. Immunol., 4, 788 (1974).
357. Theis G. A., Green I., Benacerraf B., Siskind G. W. J. Immunol., 102, 513 (1969).
358. Sanfilippo F., Scott D. W. Cell. Immunol., 21, 112 (1976).
359. Humphrey J. H. Immunology, 7, 462 (1964).
360. Naor D., Sulitzeanu D. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 36, 112 (1969).
361. Katz D. H. J. Exp. Med., 134, 201 (1971).
362. Louis J., Chiller J. M., Weigle W. O. J. Exp. Med., 137, 461 (1973).
363. Möller G., Sjöberg O., Möller E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 181, 134 (1971).
364. Sjöberg O., Möller E. Nature, 228, 780 (1970).
365. Möller E., Sjöberg O. Transplant. Rev., 8, 26 (1972).
366. Humphrey J. H., Keller H. U. In: Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure, ed. by J. Sterzl and I. Riha, p. 485, Czechoslovakian Academy of Science, Prague, 1970.
367. Ada G. L., Transplant. Rev., 5, 105 (1970).
368. Cooper M. G., Ada G. L., Langmann R. E. Cell. Immunol., 4, 289 (1972).
369. Sjöberg O. J. Exp. Med., 133, 1015 (1971).
370. DeLuca D., Decker J., Miller A., Sercarz E. Cell. Immunol., 10, 1 (1974).
371. DeLuca D., Miller A., Sercarz E. Cell. Immunol., 18, 255 (1975).
372. DeLuca D., Miller A., Sercarz E. Cell. Immunol., 18, 274 (1975).
373. DeLuca D., Miller A., Sercarz E. Cell. Immunol., 18, 286 (1975).
374. Miller A., DeLuca D., Decker J., Ezzell R., Sercarz E. Am. J. Pathol., 65, 451 (1971).
375. Möller G., Berystedt S., Dal S., Fernandez C., Möller E., Ramos T. Ann. N. Y. Acad. Sci., 392, 23 (1982).
376. Jerne N. K. Ann. Immunol., 125C, 373 (1974).
377. Fernandez C., Möller G. Scand. J. Immunol., 11, 53 (1980).
378. Fernandez C., Möller G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5944 (1979).
379. Binz H., Wigzell H. J. Exp. Med., 144, 1438 (1976).
380. Binz H., Wigzell H. Transplant. Proc., 11, 914 (1979).
381. Green D. R., Eardley D. D., Kimura A., Murphy D. B., Yamauchi K., Gershon R. K. Eur. J. Immunol., 11, 973 (1981).
382. DeKruyff R. H., Simonson B. G., Siskind G. W. J. Exp. Med., 154, 1188 (1981).
383. Green D. R., Gershon R. K. Ann. N. Y. Acad. Sci., 392, 318 (1982).
384. Streilein J. W., Gruchalla R. S., Wood P., Strome P. Ann. N. Y. Acad. Sci., 392, 276 (1982).

Регуляция функций Т- и В-клеток лимфокинами

Кендалл А. Смит

(Kendall A. Smith)

Три уникальные особенности иммунной системы — специфичность, разнообразие и наличие памяти — привлекали внимание ученых на протяжении прошедшего века. Заметный прогресс в изучении первых двух из этих характерных особенностей был обусловлен успехами в изучении структуры и функции молекул антител. Третья особенность, иммунная память, пока еще не нашла исчерпывающего объяснения. При обсуждении иммунной памяти всегда имеется в виду и проблема регуляции, поскольку в отличие от простого анамнеза (от греч. *anamnesis* — воспоминание) анамнестический иммунный ответ (или вторичный иммунный ответ) «отражает способность организма или иммунокомпетентных клеток отвечать ускоренно и с повышенной интенсивностью на повторную стимуляцию антигеном, который уже вводился ранее» ([1], стр. 848). Таким образом, определение вторичного иммунного ответа как «простого воспроизведения прошлых событий» не отражает уникальной физиологии иммунного ответа. В отличие от интеллектуальной памяти иммунная память улучшается с каждым повторным введением стимула, и в результате ответ происходит быстрее и с большей интенсивностью. В результате быстрого развития клеточной иммунологии в последние 20 лет мы теперь знаем, что феномен иммунологической памяти объясняется частично способностью иммуноцитов к самовоспроизводству и пролиферативному разрастанию клона при антигенной стимуляции. Поэтому отличительная особенность ответа на повторное введение антигена состоит в том, что после первичного столкновения организма с антигеном клональный рост популяции лимфоцитов происходит с повышенной интенсивностью и приводит к образованию большего числа реагирующих с антигеном клеток. Поскольку лимфокины регулируют пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов, в данной главе будет рассмотрено современное состояние наших знаний о том, как эти иммунологически неспецифические факторы могут вносить свой вклад в формирование специфической иммунологической памяти.

Чтобы найти экспериментальные подходы к изучению лимфокинов, которые могут рассматриваться как продукты лимфоцитов, отличные от антител, целесообразно ознакомиться с развитием представлений о структуре и функции антител. До того как была выяснена структура иммуноглобулинов, проблемы, стоявшие перед исследователями, не слишком отличались от тех, с которыми сталкиваются на современном этапе исследователи лимфокинов. Тут следует напомнить, что прежде при классификации антител исходили из их основной функции, обнаруживаемой в опытах *in vitro*. Так, в свое время мы говорили об агглютинаинах, преципитинах, опсонинах и гемолизинах. Произошедшая позднее дифференциация этих кажущихся различными функций и соотнесение их

с определенными классами иммуноглобулиновых молекул стали возможными благодаря использованию клеток, секретирующих один тип антител. Несмотря на то что концентрация антител в плазме крови очень велика (например, содержание сывороточного IgG составляет 10^{-4} М), гетерогенность и разнообразие иммуноглобулиновых молекул существенно затрудняли выяснение структуры и функции каждой отдельной молекулы. Поэтому, когда выяснилось, что плазматитомы секретируют в больших количествах моноклональные антитела, исследователи получили клеточные и молекулярные инструменты, необходимые для исследования структуры иммуноглобулинов. Кроме того, установление структуры иммуноглобулинов было существенно для понимания их функции.

Особенно примечательно существование определенных параллелей между современным состоянием наших представлений о лимфокинах и состоянием иммунологии до выяснения структуры антител. Лимфокины были обнаружены и названы в соответствии с функциональными свойствами, проявляемыми в опытах *in vitro*. Поэтому, подобно агглютиниnam и гемолизинам в прошлом, мы использовали такие термины, как лимфоцит-активирующий фактор, фактор, заменяющий Т-клетки и хелперный фактор клеток-киллеров. Однако в отличие от ситуации, с которой мы столкнулись при изучении иммуноглобулинов, лимфокины действуют в значительно более низких концентрациях. Большая часть данных (в тех случаях, когда подобные данные имеются) свидетельствует о том, что лимфокины проявляют активность в области концентраций от 10^{-10} до 10^{-12} М. Эти концентрации очень близки к тем, которые встречаются в большинстве эндокринных систем, и наша экспериментальная задача заключалась в выделении индивидуальных лимфокинов из надосадочной жидкости, получаемой при культивировании лимфоцитов и содержащей сложный, функционально разнообразный набор полипептидов, каждый из которых присутствует в очень низких концентрациях.

Решение подобной задачи осложнялось заметной гетерогенностью клеток-мишеней. Становилось все более очевидным, что лимфоциты, гомогенные морфологически, в действительности весьма гетерогенны функционально. Основная причина, обусловившая обнаружение большого количества на первый взгляд непохожих лимфокинов, заключалась в том, что эти соединения различали и называли, исходя из опытов *in vitro*, в которых использовались гетерогенные клеточные популяции. На первых порах делалась попытка выделить и охарактеризовать индивидуальные лимфокины, используя в качестве источника культуральную среду, в которой могло содержаться несколько похожих, но неидентичных лимфокинов, и применяя тест-системы, содержащие не менее гетерогенные смеси лимфоцитов-мишеней. Помимо этих трудностей большинство используемых систем тестирования требовало длительного культивирования клеток, и поэтому конечный результат мог быть обусловлен рядом клеточных реакций, в которых могли принимать участие несколько лимфокинов. Например, для образования антителосекретирующих клеток из малых покоящихся В-лимфоцитов требуются переход последних в активированное состояние, пролиферация, дифференцировка в клетки, секретирующие иммуноглобулины, и последующее переключение биосинтеза изотипа тяжелой цепи.

Как станет очевидным из дальнейшего обсуждения, первоначальное решение этого казалось бы неразрешимого вопроса, связанного с гетерогенностью лимфокинов и клеток-мишеней, сводилось к развитию методов выделения клонов функционально активных клеток-мишеней. Только исключив гетерогенность этих клеток, стало возможным приступить к индивидуальной характеристике огромного числа лимфокинов. Однако выделение и характеристика лим-

фокинов — дело не столь простое, как это может показаться с первого взгляда, даже при использовании однозначных, быстрых, количественных биологических методов, которые появились благодаря наличию моноклональных, функционально активных популяций клеток-мишеней. Примером может служить прошлый опыт изучения иммуноглобулинов, а также более поздний опыт успешного выделения интерферона. В обоих случаях ключом к успешной очистке этих биологически активных соединений явился правильный выбор источника материала. Доктор Эдвард де Мейер (Edward de Maeyer) так суммирует опыт работы с интерфероном:

«Почему выделение интерферона заняло 20 лет? В 1958 г. наши системы генерации интерферона давали около десяти ед/мл, и большинство исследователей работали с разведениями активных супернатантов в интервале от 1 : 2 до 1 : 5. В это время для выделения 1 мг интерферона необходимо было 250 000 л неочищенного супернатанта! Путем селекции высокопродуктивных клеток, скорее благодаря удаче, чем мудрости, а также в результате изучения фундаментальных основ процесса образования интерферона наступил момент, когда выход этого белка достиг 10^5 — 10^6 ед/мл и для получения 1 мг требовалось 25 л культуральной среды. Таким образом, одним из решающих факторов в успешном выделении интерферона было значительное увеличение эффективности его образования ([2], стр. 313)».

Другое соображение, о котором нельзя забывать при исследовании «факторов», влияющих на функцию лимфоцитов,— это наличие уникальных свойств лимфоцитов, отличающих их от других клеток крови. У всех клеток крови процесс созревания начинается с плюрипотентной стволовой клетки и заканчивается зрелой гематопоетической клеткой. Известно, что в процессе созревания происходит пролиферативный рост популяции гематопоетических клеток, сопровождающийся одновременными изменениями в ядре и цитоплазме, в результате которых зрелая клетка крови приобретает характерные черты. Во всех случаях, за исключением лимфоцитов и моноцитов, этот процесс приводит к образованию зрелых и окончательно дифференцированных клеток, не способных к самовоспроизводству или дальнейшим изменениям. Наиболее яркими примерами таких окончательно дифференцированных клеток могут служить эритроциты, тромбоциты и полиморфоядерные лейкоциты. Другими словами, у большинства клеток крови созревание и дифференцировка происходят одновременно. Напротив, созревание и дифференцировка лимфоцитов идут в разное время. Поэтому применительно к лимфоцитам целесообразно использовать термин *созревание* для описания тех клеточных изменений, которые имеют место при превращении стволовой клетки в зрелую, фенотипически узнаваемую Т- или В-клетку. Термин *дифференцировка* следует сохранить для клеточных изменений, происходящих после антигенной стимуляции зрелых лимфоцитов и приводящих к функционально активным, дифференцированным антителосекретирующим плазматическим клеткам или цитолитическим, или же супрессорным и хелперным Т-клеткам. Такое разделение существенно при рассмотрении лимфокинов, поскольку различные факторы могут участвовать в процессах пролиферации и созревания в лимфопоэзе и в процессах пролиферации и дифференцировки, наступающих после антигенной стимуляции.

Очевидно, что подробное рассмотрение всех лимфокинов потребовало бы написания отдельного учебника. К лимфокинам относят интерлейкины, гематопоетические колониестимулирующие факторы, факторы, модулирующие активность макрофагов, интерфероны и факторы хемотаксиса. Хотя все эти недавно обнаруженные лимфокины могут играть какую-то роль в формировании

наших защитных реакций, в данной главе мы рассмотрим лишь те из лимфокинов, которые предположительно участвуют в пролиферации и дифференцировке зрелых Т- и В-клеток.

21.1. Лимфокины и Т-клеточный иммунный ответ

21.1.1. Исторический очерк

Изучение лимфокинов, действующих на Т-клетки, в основном ограничивалось факторами, выполняющими роль митогенов. Объяснялось это тем, что в течение более чем 10 лет — с 1960 по 1972 г. — не было ни одного теста, кроме теста на пролиферацию Т-клеток. Когда были разработаны методы, позволяющие исследовать образование *in vitro* антителообразующих клеток, а также цитолитических, хелперных и супрессорных Т-лимфоцитов, появилась возможность при изучении лимфокинов анализировать и указанные процессы дифференцировки. Однако в большинстве случаев из-за сложности применяемых методов было трудно отличить вклад лимфокинов, вызывающих пролиферацию, от вклада лимфокинов, обуславливающих дифференцировку.

История изучения митогенных лимфокинов подробно рассматривается в отдельных обзорах [3,4], и нет никакой необходимости останавливаться здесь на ней, кроме лишь как для того, чтобы описать некоторые открытия, обусловившие наиболее существенные успехи в изучении этого вопроса. Область клеточной иммунологии берет свое начало от пионерской работы Ноуэлла (Nowell), обнаружившего, что растительные лектины, например фитогемагглютинин (ФГА), вызывает митоз лимфоцитов [5]. До этого открытия лимфоциты считались окончательно дифференцированными клетками, не способными к самовоспроизводству. Вскоре Касакура и Левенштейн [6], а также Гордон и Мак-Лин [7] независимо показали, что в супернатантах культур человеческих лейкоцитов присутствуют растворимые митогенные факторы. Хотя вначале предполагалось, что митогенные факторы продуцируются лимфоцитами, Бах и др. [8] обнаружили, что прилипающие клетки выделяют растворимые факторы, также обладающие митогенными свойствами. Эти данные были впоследствии подтверждены и расширены работами Гери и др. [9,10], которые ввели термин «лимфоцит-активирующий фактор» (ЛАФ, LAF) для обозначения митогенного фактора макрофагального происхождения. Экспериментальное изучение митогенных факторов, которые, как считалось, имели либо Т-клеточное, либо макрофагальное происхождение, оказалось трудной задачей, поскольку методы, используемые для обнаружения этих активностей, были очень похожи.

Следует отметить, что, согласно господствовавшей в 1965—1978 гг. точке зрения, функциональная роль митогенных факторов заключалась в амплификации Т-клеточного пролиферативного ответа, главной движущей силой которого считался лиганд (антиген или митоген). Эта концепция явилась логическим следствием требований, предъявляемых теми тест-системами, которые использовались тогда для определения биологической активности: для проявления митогенной активности лимфокинов необходимо было добавлять к культурам либо лектины, либо антигены.

Ключевым моментом, позволившим выделить и охарактеризовать митогенные лимфокины, продуцируемые макрофагами и Т-клетками, и понять их функциональную значимость явились данные Моргана и др. [11] о том, что кондиционированная среда от стимулированных лектинами периферических мононуклеарных клеток крови способна поддерживать длительную пролифера-

цию культур Т-клеток. Это открытие, которое поистине можно назвать пионерским, открыло возможность длительного культивирования [12] и получения клонов функционально активных Т-клеток [13—15]. В результате впервые стало возможным изучать влияние митогенных лимфокинов на клонированные популяции клеток. С устранением неоднозначности, свойственной тест-системам, в которых использовалась смешанная популяция клеток-мишеней, появилась возможность разработать быстрый количественный метод для обнаружения митогенных лимфокинов, присутствовавших в разных кондиционированных средах [16].

С помощью теста на рост Т-клеток впервые было убедительно показано, что митогенные факторы, продуцируемые макрофагами и Т-лимфоцитами, различны: супернатанты, явно содержащие ЛАФ (о чем судили по стимуляции пролиферации тимоцитов), не были митогенными для клонированных цитотоксических линий Т-лимфоцитов (ЦЛТЛ, CTLL) [17]. В последующих экспериментах была обнаружена функциональная взаимосвязь между этими двумя факторами: одновременно несколько групп исследователей показали, что ЛАФ вызывает пролиферацию Т-клеток, стимулируя синтез фактора роста, продуцируемого Т-лимфоцитами (ТЛФР, TCGF) [18—21]. Стало очевидным, что именно фактор роста Т-клеток является тем фактором, который отвечает за митоз Т-клеток, и что функция лектинов и антигенов заключается в инициации образования как ЛАФ, так и ТЛФР. Кроме того, антигены и лектины переводят Т-клетки в состояние в котором они способны специфически отвечать на фактор роста Т-клеток [22].

В результате всех этих работ стало ясно, что наконец наступил момент, когда появилась возможность начать выделение и характеристику по меньшей мере одного из факторов, которые исследователи изучали на протяжении почти 15 лет, используя неоднозначные тесты на пролиферацию лимфоцитов. Тот факт, что ЛАФ и ТЛФР неидентичны, но взаимосвязаны, помог установить более стандартную номенклатуру: ЛАФ был переименован в интерлейкин 1, (ИЛ-1, IL-1), а фактор роста Т-клеток — в интерлейкин 2 (ИЛ-2, IL-2) [23]. Большинство исследователей, изучавших митогенные факторы Т-клеточного происхождения, которые были названы в соответствии с проявляемой *in vitro* биологической активностью, например митогенный фактор тимоцитов (ТМФ, TMF), тимокит-активирующий фактор (ТАФ, TAF), тимокит-стимулирующий фактор (ТСФ, TSF), хелперный фактор киллеров (КХФ, KHF), фактор, индуцирующий вторичные цитотоксические клетки (ФИБЦК, SCTF), лимфоцитарный митогенный фактор (ЛМФ, LMF). Таким образом, как это случилось ранее с иммуноглобулинами, на смену функциональной номенклатуре Т-клеточных митогенных лимфокинов пришла новая, отвлеченная.

Однако позднее обнаружили противоречия, связанные с номенклатурой интерлейкинов. Они остались неразрешенными до настоящего времени и серьезно осложняют интерпретацию исследуемых биологических процессов. Противоречия возникли главным образом потому, что введение подобной номенклатуры было преждевременным. Несмотря на то что тест-система, используемая для обнаружения фактора роста Т-клеток, однозначно свидетельствовала о различии ИЛ-1 и ИЛ-2, не было достаточно надежных биохимических данных, позволяющих приписать всю биологическую активность ИЛ-2 одной молекуле. Так, в качестве одной из биологических активностей ИЛ-2 первоначально предполагалась способность усиливать появление антителообразующих клеток. Обычно наличие такой активности постулирует действие ИЛ-2 не только на Т-, но и на В-клетки. Как следствие, некоторые исследователи расширили рамки определения ИЛ-2 и стали обозначать этим термином класс молекул с разно-

образным влиянием на Т- и В-клетки [24]. Подобная трактовка номенклатуры противоречила целям, которые преследовали ее авторы, и не исключено, что в результате одним и тем же термином стали обозначаться несколько различных молекул. Поскольку имеется определенная взаимосвязь между номенклатурой и нашими представлениями о биологических процессах, эта тенденция приостановила дальнейшее разграничение лимфокинов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов, и в настоящее время направление, изучающее лимфокины, находится в динамическом состоянии. Скорее всего терминология и принятые сейчас биологические концепции в будущем изменятся. Поэтому очень важно понимать природу противоречий номенклатуры и их последствия для трактовки биологических процессов. Действительно, дальнейшее развитие наших представлений о лимфокинах зависит от постановки экспериментальных вопросов, что тесно связано с используемой нами номенклатурой и определениями. В связи с тем что первоначальное название изучаемых лимфокинов по-прежнему основывается на измеряемой биологической активности, по-видимому, лучше всего продолжать именовать интерлейкины в соответствии с этими активностями до тех пор, пока не будут получены однозначные биохимические данные, которые позволят отличить молекулы друг от друга. Здесь уместна аналогия с иммуноглобулинами: хотя и IgM, и IgG оба являются иммуноглобулинами, их структура и спектр биологических активностей заметно различаются. Поэтому термин *интерлейкин*, обозначающий в настоящее время класс биологически активных молекул, аналогичен термину *иммуноглобулин* и подразумевает наличие внутри семейства интерлейкинов нескольких типов молекул, различных по структуре и выполняемой функции. Пока название IL-1 следует закрепить за синтезируемым макрофагами фактором, усиливающим секрецию IL-2 Т-клетками и таким путем способствующим пролиферации Т-лимфоцитов. Название IL-2 следует сохранить за продуцируемым Т-клетками фактором, стимулирующим митоз Т-лимфоцитов. При желании приписать этим молекулам другие биологические активности исследователю надлежит доказать, что изучаемая активность обусловлена той же самой молекулой, а не другими лимфокинами, которые могут находиться в частично очищенных препаратах. Только при соблюдении известной строгости можно будет достигнуть успехов в выяснении структуры и функции этих иммунологически важных молекул.

21.1.2. Интерлейкин 1

21.1.2.1. Функциональные аспекты

IL-1 приписывают разнообразные биологические эффекты (например, активацию Т-клеток, регуляцию температуры тела, стимуляцию пролиферации фибробластов, активацию синовиальных клеток) [25], однако поскольку биологическую активность IL-1 традиционно тестируют по пролиферации тимоцитов и поскольку эксперименты, свидетельствующие о наличии у IL-1 дополнительных активностей, были проведены с неочищенными или частично очищенными препаратами IL-1, по-видимому, надежнее ограничить обсуждение функциональной ролью IL-1 в пролиферации Т-клеток. Следует отметить, что до последнего времени недооценивали важную роль IL-1 макрофагов в активации Т-клеток. Объясняется это главным образом тем, что вызываемая антигеном активация Т-клеток считалась зависимой от макрофагов, в то время как активация, вызываемая лектинами, — независимой от макрофагов. Таким образом, предполагалось, что вклад макрофагов ограничивается процессингом анти-

генов и презентированием их Т-клеткам вместе с продуктами главного комплекса гистосовместимости. Важная роль макрофагов в индуцируемом лектинами ответе была признана лишь после того, как появилась возможность тщательного удаления макрофагов до уровня, при котором можно было продемонстрировать участие IL-1 в активации Т-клеток [26]. Теперь стало очевидным, что в роли вспомогательных клеток макрофаги дают покоящимся Т-клеткам сигналы, по крайней мере, трех типов: презентирование антигена, активацию Ia и секрецию IL-1. Вопрос о том, в какой последовательности поступают эти сигналы и каков их молекулярный механизм, остается нерешенным.

В основе традиционного метода определения IL-1 лежит его митогенное действие на мышинные тимоциты. Поскольку для индукции IL-1 главным образом используют бактериальный липополисахарид (ЛПС) (соединения, применяемые для индукции IL-1, обсуждаются в работе [27]), то в опытах обычно берут тимоциты мыши СЗН/НеJ, не отвечающие на ЛПС. Выбор тимоцитов, а не периферических Т-лимфоцитов в качестве клеток-мишеней обусловливается двумя обстоятельствами. Во-первых, суспензия тимоцитов содержит менее 0,1% прилипающих клеток, что позволяет избежать утомительной и трудоемкой процедуры удаления макрофагов, и, во-вторых, пролиферативный ответ на IL-1 у тимоцитов, обычно выше, чем у периферических Т-лимфоцитов. Для оптимального ответа на IL-1 важное значение имеет концентрация клеток. Как правило, плотность культуры тимоцитов составляет $(1-1,5) \cdot 10^7$ клеток/мл [28, 29]. Чем объясняется необходимость высокой концентрации клеток, не совсем понятно. Скорее всего это означает, что для развития ответа необходима определенная субпопуляция тимоцитов, содержание которой незначительно. И наконец, IL-1 не обладает прямым митогенным действием на тимоциты, если они не активированы лектином или антигеном. Поэтому обычно анализ проводят, культивируя СЗН/НеJ-timoциты в концентрации $1,0 \cdot 10^7$ клетка/мл в присутствии ФГА при разных концентрациях образца IL-1. Кинетика пролиферативного ответа, оцениваемая по включению меченного тритием тимидина ($^3\text{H-Tdr}$), при оптимальной концентрации IL-1 показана на рис. 21.1, А, а зависимость ответа от концентрации IL-1 — на рис. 21.1, Б. Величина пролиферативного ответа может быть выражена в единицах на 1 мл с помощью пробит-анализа, описанного для интерферона и фактора роста Т-клеток [16]. Число единиц IL-1 в образце определяют, умножая на 10 обратную величину от разведения образца, активность которого составляет 50% от максимальной [16]. Следовательно, если образец имеет активность 100 ед./мл, его титр равен 1 : 10. Описаны и другие методы анализа активности IL-1, в которых используются клонированные линии трансформированных Т-клеток [30, 31], однако данные методы не нашли широкого применения главным образом потому, что тестирование становится двухступенчатой процедурой. В этих тест-системах количество IL-1 оценивается по усилению секреции клетками-мишенями IL-2: величина этого эффекта зависит от концентрации IL-1.

В результате работ, проведенных несколькими группами исследователей, стало общепризнано, что IL-1 индуцирует пролиферацию Т-лимфоцитов, вызывая секрецию Т-клетками IL-2 [18—21]. Если из клеточной популяции тщательно удалить макрофаги, при введении антигена или митогена наблюдается бласт-трансформация лимфоцитов, но не секреция IL-2 и не биосинтез ДНК, оцениваемый по включению $^3\text{H-Tdr}$ [32]. Более того, в отсутствие макрофагов не идет и митоз. Был сделан (хотя строго и не доказан) вывод, что на начальном этапе активации Т-клеток лектин или антиген связывается со специфическими участками клеточной мембраны, вызывая переход клеток из фазы G_0 в раннюю фазу G_1 . Эти изменения происходят в течение первых 12—24 ч. куль-

Рис. 21.1. Тестирование IL-1 на мышиных тимocyтах.

А. Кинетика митогенного эффекта IL-1. Тимocyты мыши СЗН/HeJ ($1 \cdot 10^7$ клетка/мл) культивировали 1) в среде без добавок (*темные кружки*); 2) с фитогемагглютинином (*светлые кружки*); 3) с максимально стимулирующей концентрацией (разведение 1 : 20, см. **Б**) IL-1, полученной стимуляцией липополисахаридом мононуклеарных клеток человека (*темные треугольники*); 4) с фитогемагглютинином и IL-1 (*светлые треугольники*). В указанное время, за 4 ч до прекращения культивирования, к клеткам добавляли ^3H -тимидин.

Б. Влияние концентрации IL-1 на включение ^3H -тимидина тимocyтами, оцененное через 72 ч после начала культивирования в отсутствие (*светлые кружки*) и в присутствии (*темные кружки*) фитогемагглютенина (1 мкг/мл). ([4]; печатается с разрешения.)



тивирования и приводят к морфологическим изменениям, характеризующимся как бласттрансформация лимфоцитов. Если к таким «активированным» лимфоцитам добавляется IL-1, начинается секреция IL-2, после чего клетки завершают клеточный цикл и делятся. Клетки могут проходить клеточный цикл и в отсутствие IL-1, если к ним добавляют IL-2. Указанный факт говорит о том, что сигналом к митозу служит IL-2, а не IL-1 [32].

Это предположение подтвердили эксперименты, в которых синтез IL-2 был заторможен. Например, митогенное действие IL-1 снижалось под действием глюкокортикоидов — ингибиторов биосинтеза IL-2. Тормозящий эффект при этом зависел от дозы ингибитора [19]. Митогенного действия IL-1 не наблюдалось, если в качестве клеток-мишеней использовались спленоциты молодых бестимусных мышей, не способных к синтезу IL-2 [19].

Механизм взаимодействия IL-1 с Т-клетками пока еще не изучен. Остается неясным, должны ли Т-клетки взаимодействовать с лектином или антигеном для того, чтобы приобрести способность отвечать на IL-1, или IL-1 взаимодействует с необученными, покоящимися Т-клетками. Получены некоторые данные, свидетельствующие о том, что IL-1 взаимодействует со специфическим клеточным рецептором; так, активированные лектином лейкозные Т-лимфоциты способны адсорбировать IL-1 [31]. Однако эти данные следует интерпретировать с осторожностью, поскольку аналогичные эксперименты с нормальными клетками-мишенями окончились неудачей.

21.1.2.2. Биохимическая характеристика

В связи с тем что недавно были опубликованы обзоры [4, 25], в которых подробно обсуждаются биохимические свойства IL-1 мыши и человека, читателям для получения детальной информации рекомендуется использовать указанные источники. Следует отметить трудность оценки существенной части аналитических биохимических исследований, выполненных до 1980 г., так как количественного анализа активности IL-1 в процессе выделения не проводилось: биологическую активность определяли лишь для одной концентрации каждой полученной фракции (как правило, для разведения 1 : 4). Кроме того, в большинстве случаев биохимической очистке подвергались незначительные количества кондиционированной среды (1—10 л), причем до последнего времени большая часть исследований была осуществлена с супернатантами культур клеток, которые были активны в разведенных от 1 : 5 до 1 : 10. Если биологическая активность IL-1 в количественном отношении подобна активности интерферона, то, по-видимому, концентрация IL-1 в этих супернатантах была очень низка. Действительно, по недавним оценкам 1 ед./мл IL-1 эквивалентна $7 \cdot 10^{-11}$ М [33]. Поскольку полученная обычным способом кондиционированная среда содержит 10 ед. IL-1 на 1 мл, то в 1 л ее находится 10 мкг IL-1. В результате, если принять во внимание опубликованные данные о выходе IL-1 после очистки (2—4% от исходного препарата), оказывается, что для выделения 1 мг чистого IL-1 потребовалось бы более 1600 л среды.

Недавно мышинный IL-1 был очищен до гомогенного состояния, что стало возможным главным образом благодаря разработке методики усиленного образования IL-1, увеличивающей концентрацию его в среде в 10—20 раз [33]. Целесообразно подробно рассмотреть эту работу, поскольку она наглядно демонстрирует, с какими проблемами приходится сталкиваться при очистке лимфокинов.

Источником IL-1 служили клетки мышинной макрофагоподобной клеточной линии P388D₁, которые выращивали до образования монослоя в сосудах для культивирования клеток с площадью 30 см². Методика стимуляции включала четырехчасовую инкубацию с форболмиристатацетатом (10 мкг/мл), циклогексимидом (10 мкг/мл) и бутиратом натрия (2мМ), последующую отмывку клеток, инкубацию в течение 1 ч в присутствии актиномина D (10 мкг/мл) и, наконец, культивирование в течение еще 24 ч в среде RPMI 1640, содержащей 1% сыворотки плода коровы и 2 мМ бутирата натрия. Описанный метод стимуляции давал от 800 до 1500 ед./мл IL-1 (т. е. титр IL-1 составлял от 1 : 80 до 1 : 150). Из-за добавки в культуральную среду 1% сыворотки плода коровы концентрация белка была весьма высокой (264 мг/л). Как видно из табл. 21.1, 4,78 л такой среды последовательно подвергали осаждению сульфатом аммония, хроматографии на фенолсефарозе и ультрагеле АсА54 и изоэлектрофоку-

Таблица 21.1. Выделение IL-1 ([33]; печатается с разрешения)

Этап выделения	Объем, мл	Титр	Ед./мл	Содержание белка, мг	Удельная активность, ед./мг	Выход, %
Неочищенный супернатант	4790	92	920	1 262	3 490	100
Сульфатаммонийный осадок	69	4 347	43 478	431	7 000	69
Фенолсефароз	5	10,800	108 000	49	10 930	12
Ультрагель АсА54	53	528	5 283	6	49 040	6
Изоэлектрофокусирование	4	1 650	16 500	0,064	1 037,000	2

сированию (ИЭФ). Тридцать процентов активности терялось при осаждении сульфатом аммония, однако оно было необходимо для уменьшения объема супернатанта до такого, с которым можно работать на следующей стадии разделения. Значительные потери IL-1 имели место и в процессе гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе: после этой стадии сохранялось лишь 12% первоначальной активности. Если пересчитать на объем исходного супернатанта, то окажется, что на этой стадии исследователи имели дело только с эквивалентом 574 мл IL-1-содержащей среды, и хотя активность повышалась более чем в 1000 раз (от 920 до 108 000 ед./мл) из-за большого количества белка (49 мг), удельная активность возросла лишь в три раза (от 3490 до 10 930 ед./мг). В результате двух следующих стадий очистки (а именно хроматографии на ультрагеле и ИЭФ) активность снизилась еще в 8 раз. В итоге после удаления большей части посторонних белков была достигнута 300-кратная очистка IL-1 (с 3 490 до 1 037 000 ед./мг). Однако из-за больших потерь биологической активности из четырех литров исходного супернатанта был получен образец объемом 4 мл, содержащий очень незначительное количество биологически активного IL-1: титр препарата по сравнению с исходным возрос всего в 18 раз, а именно от 1 : 92 до 1 : 650.

Описанный эксперимент демонстрирует характерные трудности, с которыми приходится сталкиваться при попытке препаративного выделения лимфокинов из кондиционированной среды, содержащей сыворотку. Единственным методом, пригодным для уменьшения объема препарата, является осаждение сульфатом аммония, поскольку присутствие сыворотки препятствует концентрированию с помощью ультрафильтрации или вакуумного диализа. Действительно, 70-кратное концентрирование фильтрованием (эквивалент концентрирования, полученного при осаждении сульфатом аммония) дало раствор, содержащий 70% сыворотки плода коровы (СПК) (47,8 мл СПК в 69 мл раствора). При описанной схеме выделения после первой стадии очистки сохраняется лишь 12% первоначальной активности. Низкий выход IL-1 сильно затрудняет его выделение в количествах, достаточных для изучения биологических функций, что в свою очередь препятствует исследованию механизма действия IL-1. И вновь следует вспомнить опыт работы с интерфероном. Препаративное выделение IL-1 могло бы стать несравненно проще, если бы, используя не содержащую сыворотку среду, удалось достичь увеличения исходной активности хотя бы в 100—1000 раз.

Секретируемый клетками P388D₁ мышинный IL-1, изученный наиболее полно, обладает следующими свойствами: по данным гель-фильтрации и электрофореза в полиакриламидном геле это белок с кажущейся массой от 12 до 16 кДа, чувствительный к действию протеиназ. Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле препарата, частично очищенного по схеме, приведенной в табл. 21.1, выявил наличие четырех различных окрашиваемых пятен в области 14 кДа, различающихся по изоэлектрическим точкам. По-видимому, только три из них обладают активностью IL-1, поскольку с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере удастся выделить лишь три белка, различающихся по заряду и вызывающих пролиферацию тимочитов [33]¹.

¹ Строение IL-1 человека было определено по структуре соответствующего гена [85]. Имеется по крайней мере два типа IL-1, существенно различающихся по аминокислотной последовательности: кислый (pI 5.0) IL-1 α и нейтральный (pI 7.0) IL-1 β . Оба типа IL-1 синтезируются в виде крупных белков-предшественников, состоящих соответственно из 271 и 269 аминокислотных остатков. Зрелый внеклеточный IL-1 представляет собой С-концевой фрагмент молекулы размером 159 (IL-1 α) или 153 (IL-1 β) аминокислот. Обе формы

21.1.2.3. Дальнейшие перспективы

Тот факт, что растворимые макромолекулы, синтезируемые макрофагами, усиливают секрецию IL-2, в существенной степени помог объяснить необходимость макрофагов для Т-клеточного пролиферативного ответа *in vitro*. Еще предстоит выяснить, объясняется ли обнаруженная гетерогенность IL-1 по заряду наличием нескольких родственных, но не идентичных пептидов или же вариация заряда обусловлена разной степенью гликозилирования одного и того же пептида. Следует также подчеркнуть, что при использовании современных методов биохимической очистки микрогетерогенность пептида может остаться незамеченной. Поэтому следует соблюдать осторожность, приписывая способность вызывать митоз Т-лимфоцитов лишь одному полипептиду. Аналогичным образом, прежде чем считать, что пептид известный нам как IL-1 (определяемый по пробе на пролиферативную активность тимоцитов), проявляет несколько биологических активностей, следует провести биологические испытания гомогенного пептида. Что касается влияния IL-1 на Т-клетки, остается неясным, действует ли он на определенную субпопуляцию Т-клеток или его мишенями являются все Т-клетки. Кроме того, остается открытым вопрос, ограничивается ли действие IL-1 стимуляцией секреции IL-2 или он вызывает в Т-клетках и другие изменения. По-видимому, индуцируемая лектином (или антигеном) способность Т-клеток отвечать на IL-2 не зависит от IL-1, поскольку IL-2 вызывает митоз активированных лектином Т-клеток и в отсутствие IL-1 и макрофагов [32]. Не обнаружено и синергизма в действии IL-1 и IL-2 на скорость роста клонов IL-2-зависимых цитолитических Т-лимфоцитов, неспособных к самостоятельному синтезу IL-2. Однако большая часть данных говорит о том, что клетки, синтезирующие IL-2, являются для IL-1 клетками-мишенями и что IL-1 стимулирует рост этой субпопуляции Т-клеток либо прямо, либо усиливая секрецию IL-2.

В связи с тем что IL-1 вызывает зависимый от концентрации рост Т-клеточных клонов, большой интерес представляют патофизиологические последствия дисбаланса IL-1. Поэтому исследования, которые помогут глубже изучить механизмы биосинтеза и действия IL-1, а также разработка методов обнаружения IL-1 *in vivo* должны облегчить выявление тех функций макрофагов и Т-клеток, нарушения которых лежат в основе клинических заболеваний иммунной системы.

21.1.3. Интерлейкин 2

21.1.3.1. Функциональные аспекты

Ряд данных указывает на то, что митоз Т-клеток обусловлен взаимодействием растворимых факторов, секретируемых Т-клетками, с активированными антигеном (или лектином) Т-лимфоцитами. Как уже было отмечено в предыдущем разделе, когда речь шла об IL-1, тщательное удаление макрофагов предотвращает биосинтез ДНК и деление клеток под действием антигена или лектина [26, 32]. Этот факт убедительно свидетельствует о том, что сигнал к делению

IL-1 обладают идентичным спектром биологических активностей. Осуществлено также клонирование мышиного [86] и кроличьего IL-1 [87]. Гомология IL-1 α и IL-1 β человека составляет лишь 26%. Гораздо более заметна гомология между IL-1 человека и IL-1 мыши [85].

Рецепторы IL-1 обнаружены на фибробластах, В-клетках, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр, периферических Т-лимфоцитах и РНА-timoцитах. И IL-1 α , и IL-1 β связываются с одним и тем же рецептором — белком с молекулярной массой около 79500 дальтон [88]. — *Прим. перев.*

клетка получает не от лектина или антигена. Дополнительные доводы в пользу такого предположения дает изучение механизма торможения глюкокортикоидами деления Т-клеток. Детальные исследования показали, что глюкокортикоиды ингибируют митоз стимулированных антигеном (или лектином) Т-клеток, избирательно влияя на секрецию IL-2, причем этот эффект зависит от концентрации фактора [34, 35]. Действие глюкокортикоидов не связано с общим подавлением метаболизма Т-клеток: на это указывает обратимость ингибирования пролиферации Т-клеток, вызываемого глюкокортикоидами, при добавлении в среду экзогенного IL-2.

Для решения вопроса, дает ли сигнал Т-клетке к делению антиген (или лектин) или же лимфокин, были использованы моноклональные антитела, нейтрализующие биологическую активность IL-2 и, таким образом, подавляющие пролиферацию клонированных IL-2-зависимых Т-клеточных линий [36—38]. Добавление таких антител к спленоцитам, стимулированным лектином или аллоантигеном, приводит к существенному торможению пролиферации, оцениваемому по включению $^3\text{H-TdR}$. Тем не менее эти данные следует интерпретировать с большой осторожностью, поскольку не было проверено, снимается ли избытком IL-2 торможение пролиферации такими антителами. На величину пролиферативного ответа Т-клеток могут влиять многие неспецифические ингибиторы. Поэтому необходимо проверить специфичность проявляемого антителами эффекта. Кроме того, обязательно должны быть поставлены контрольные опыты по изучению действия эквивалентных количеств антител на клетки, не зависящие в своем росте от IL-2. Гипотеза о том, что не лектин (и не антиген), а какая-то другая молекула вызывает митоз Т-клеток, подтверждается данными, впервые опубликованными Морганом и др. [11], согласно которым кондионированная среда от стимулированных лимфоцитов, а не лектин способна поддерживать длительный рост Т-клеток. Не следует считать доказанным, что биологическая активность, приписываемая IL-2, опосредуется только одной молекулой, поскольку до последнего времени гомогенный IL-2 не испытывался в опытах по изучению длительного роста лимфоцитов и действия глюкокортикоидов. Тем не менее описанные выше эксперименты, в которых было проверено, как сказывается удаление макрофагов и введение глюкокортикоидов на пролиферацию Т-клеток, показывают, что пролиферация является результатом действия растворимых факторов, а не антигенов или лектинов, которые, как считалось ранее, вызывают митоз Т-клеток.

Поскольку активность, обнаруживаемую в тесте на присутствие IL-2, все еще не следует приписывать единственной молекуле, остается неясным, вызывается ли пролиферация разных субпопуляций Т-лимфоцитов одним и тем же или разными факторами. Кроме того, как уже отмечалось для IL-1, из-за отсутствия гомогенных препаратов было бы преждевременным приписывать IL-2 какие-либо иные активности помимо способности стимулировать митоз Т-клеток. Более разумно было бы считать биологической активностью IL-2 только ту, которую можно однозначно определить, а именно способность вызывать митоз клонированных IL-2-зависимых цитолитических Т-лимфоцитов. Накапливаются данные о том, что среди лейкоцитов только активированные лектином (или антигеном) Т-клетки отвечают на IL-2. Однако еще рано делать вывод, что все субпопуляции Т-клеток пролиферируют под действием IL-2, поскольку определение его ведется по росту лишь цитолитических Т-лимфоцитов. Возможно, что Т-хелперы и Т-супрессоры отвечают на очень схожие, но не идентичные Т-клеточные факторы роста.

Проведенные недавно исследования показали, что во взаимодействии IL-2 с активированной Т-клеткой участвует мембранная молекула, обладающая свой-

ствами, характерными для рецептора полипептидных гормонов, а именно: высокой аффинностью, присутствием лишь на клетке-мишени и специфичностью к гормону [39]. Вычисленная по результатам равновесного диализа, а также по кинетике связывания биосинтетически меченного IL-2 человека целыми клетками или выделенными плазматическими мембранами константа диссоциации K_d оказалась равной $5 \cdot 10^{-12}$ М [40] (рис. 21.2). Связывание радиоактивно меченного IL-2 характеризуется кривой насыщения, причем уровень неспецифической сорбции не превышает 3—4 %. В соответствии с тем, что IL-2 вызывает

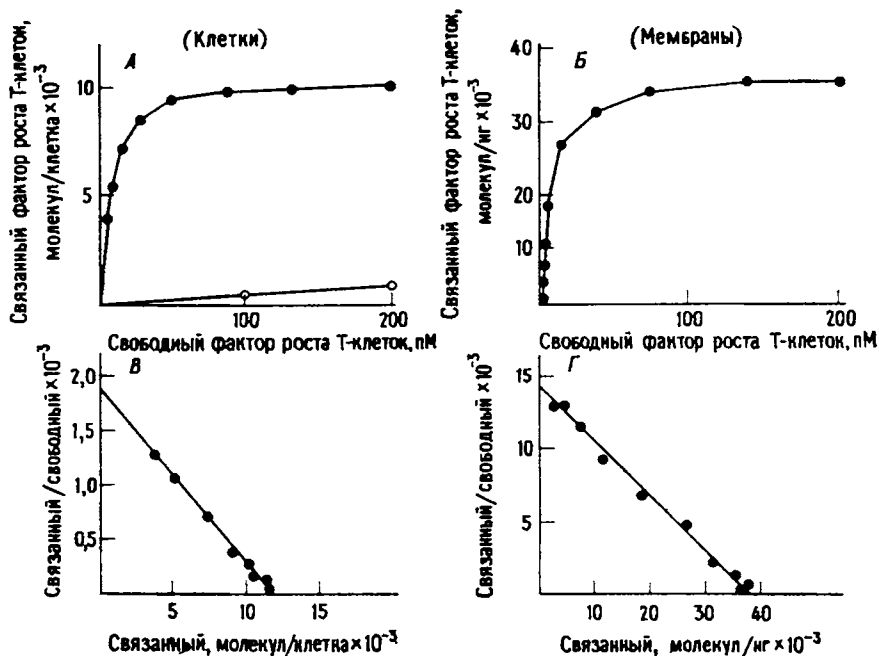


Рис. 21.2. Связывание радиоактивно меченого IL-2 с целыми клетками и выделенными плазматическими мембранами.

Биосинтетически меченный ^3H -лейцином и ^3H -лизинем фактор роста Т-клеток получен стимуляцией клона 6.2 клеток Jurkat фитогемагглютинином и фобролимистатацетатом. IL-2 был выделен из супернатанта иммуноаффинной хроматографии на моноклональных антителах (DMS-3) к IL-2. А. Связывание со стимулированными фитогемагглютинином лимфоцитами перифериче-

ской крови человека в отсутствие (темные кружки) и присутствии (светлые кружки) 100-кратного избытка немеченого IL-2. Б. Связывание с плазматическими мембранами, выделенными из клеток HUT-102В2. В. График Скэтчарда, построенный по данным опыта А после учета ненасыщаемого связывания. Г. График Скэтчарда, построенный по данным опыта Б после учета ненасыщаемого связывания. ([40]. Печатается с разрешения.)

митоз лишь активированных антигеном или лектином Т-лимфоцитов, центры связывания IL-2 обнаруживаются только на Т-клетках, стимулированных антигеном (или лектином). Радиоактивно меченный IL-2 не связывается с В-клетками (неактивированными и ЛПС-активированными В-клетками, трансформированными В-клеточными линиями): этот факт весьма существен для решения вопроса, действует ли IL-2 не только на Т-, но и на В-лимфоциты? Ввиду того что большинство экспериментов, где изучалось действие IL-2 на В-клетки, проводилось с теми концентрациями IL-2, в которых наблюдаются связывание его Т-клетками и Т-клеточная пролиферация, отсутствие заметного высокоаффин-

ного связывания радиоактивно меченного IL-2 В-клетками убедительно свидетельствует о том, что В-лимфоциты не являются мишенями IL-2.

Количество меченого IL-2, связывающегося с цельными клетками, и количество IL-2, вызывающего пролиферацию Т-лимфоцитов, практически идентичны. Тесная корреляция констант диссоциации, измеренных по равновесному связыванию IL-2 с интактными клетками или очищенными плазматическими мембранами, с константами, определенными по кинетике связывания IL-2 с плазматическими мембранами, показывает, что взаимодействие IL-2 с рецептором подчиняется физико-химическим закономерностям, характерным для взаимодействий лиганд—полимер. Следовательно, идентичность кривых, характеризующих связывание и биологический эффект, говорит о том, что в физиологических условиях переменными величинами, определяющими уровень биологического ответа, являются концентрация IL-2, число молекул рецептора и его аффинность¹.

21.1.3.2. Биохимическая характеристика

Биохимическое изучение IL-2 в существенной степени облегчалось наличием описанного выше теста, позволяющего проводить быстрый количественный анализ активных фракций [16] (рис. 21.3). По сравнению с другими методами, применяемыми в клеточной иммунологии, в которых используются свежeweделенные моноклеарные клетки, использование клонированных линий IL-2-зависимых лимфоцитов позволило уменьшить затраты времени на обнаружение биологической активности с 3—7 дней до 24 ч. Однако, как и в случае интерферона, IL-1 и других лимфокинов, для изучения биохимических свойств требовался подходящий источник IL-2. Активность IL-2, продуцируемого стимулированными лектином нормальными моноклеарными клетками, составляла 50 % от максимальной при титре лишь 1 : 10. Введение в качестве стимулятора форболмиристатацетата (ФМА) несколько увеличивало выход IL-2; таким способом удавалось повысить титр в 4—5 раз. Однако решающую роль для дальнейших биохимических исследований сыграло то, что были обнаружены мышинные [41] и человеческие [42] раковые Т-клеточные линии, стимуляция которых давала супернатанты с титром от 1 : 500 до 1 : 1000. На практике увеличение титра в 100 раз означало, что 1 л кондиционной среды от раковых клеток был эквивалентен 100 л среды от нормальных клеток. Таким образом, впервые появилась возможность получения IL-2 в количествах, необходимых для выделения активного начала.

Следует отметить, что не все исследователи использовали для количественной оценки активности IL-2 одни и те же единицы. Первоначально величину «одна единица на 1 мл» приписали количеству IL-2, содержащемуся в образце, активность которого при разведении 1 : 10 составляет 50 % от максимальной

¹ Рецептор IL-2 человека представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 251 аминокислотного остатка (см. обзор [96]). Рецептор отличается высоким содержанием углеводов (около 40% массы молекулы). В геноме человека имеется лишь одна копия структурного гена рецептора IL-2, локализованная на хромосоме 10. Имеется две группы рецепторов IL-2: высокоаффинные и низкоаффинные. Лишь первые являются функционально значимыми для Т-клеточной пролиферации. Высокоаффинный рецептор имеет дополнительную субъединицу — белок с молекулярной массой 70000-77000 дальтон [97]. Рецепторы IL-2 есть не только на Т-, но и на активированных В-лимфоцитах [98]. Активированные В-лимфоциты способны пролиферировать *in vitro* под действием гомогенного рекомбинантного IL-2. Рецепторы IL-2 обнаружены также на эмбриональных тимоцитах [99]. Значительной гомологией (более 60%) с рецептором IL-2 человека обладает его мышинный аналог — белок, состоящий из 247 аминокислотных остатков [100]. — *Прим. перев.*

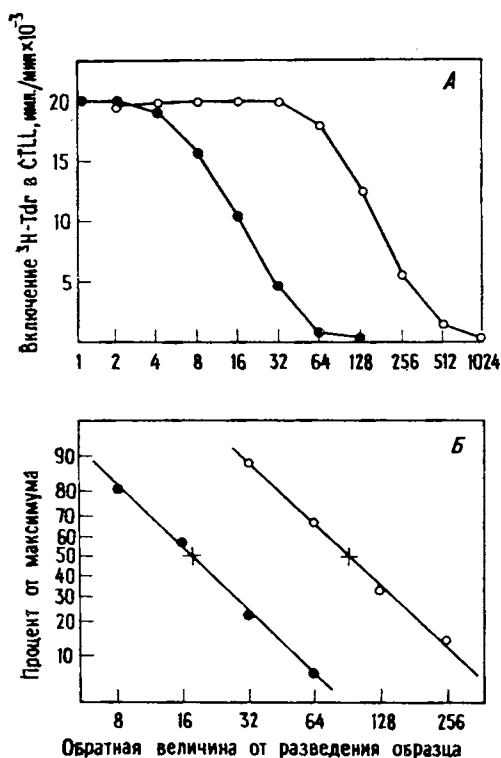


Рис. 21.3. Определение биологической активности IL-2.

Клетки CLTT-2 (клон 15Н; $4 \cdot 10^3$ клеток на лунку) инкубировали в течение 25 ч в объеме 0,2 мл с двухкратными разведениями образцов, содержащих IL-2, а затем еще 4 ч в присутствии ^3H -Tdr. А. Зависимость уровня включения ^3H -Tdr от разведения образца IL-2. И для стандарта (темные кружки), и для опытного образца (светлые кружки) зависимость ответа от логарифма концентрации IL-2 описывается сигмовидной кривой. Б. Пробит-анализ данных, приведенных на рис. А. На этом графике значимыми считаются только те точки, которые попадают в границы двух стандартных отклонений от среднего значения включения ^3H -Tdr. За титр принимается обратная величина от разведения образца, вызывающего включение ^3H -Tdr на уровне 50% от максимального. Поэтому титр стандартного образца (темные кружки) равен 16, а опытного образца (светлые кружки) — 93. Стандартному образцу условно приписывают активность 1,0 ед./мл. Для определения активности опытного образца его титр делят на титр стандарта (т. е. $93 : 16 = 5,6$ ед./мл).

[16]. При сравнении с описанными в предыдущем разделе единицами IL-1 абсолютные значения активности IL-2 окажутся в 100 раз меньше, так как для вычисления активности образца IL-2 в единицах на 1 мл необходимо обратную величину титра делить на 10, а не умножать на 10, как в случае IL-1. Некоторые исследователи стали рассчитывать число условных единиц IL-2, умножая обратную величину разведения на десять [41]. Поэтому встречающиеся в настоящее время в литературе единицы активности IL-2 могут различаться в 100 раз. Очевидно, что проблема могла бы быть решена введением международного стандарта, как это было сделано в других областях.

Первые биохимические исследования IL-2 мыши и человека, в которых использовалась кондиционированная среда от нормальных клеток, показали, что при гель-фильтрации биологическая активность элюируется одним пиком. Однако, как и IL-1, IL-2 оказался гетерогенным по заряду: при изоэлектрофокусировании IL-2 обнаруживался в различных фракциях [43]. Хотя гетерогенность по заряду могла быть обусловлена посттрансляционными модификациями или деградацией полипептидной цепи, нельзя было исключить и такой возможности, что митоз Т-клеток вызывается несколькими разными полипептидами. Тем не менее в отличие от ситуации с IL-1 детальное исследование различающихся по заряду форм IL-2 человека показало, что причина заключается в неодинаковой степени сialiрирования и гликозилирования молекул [44]. При отщеплении нейраминидазой от IL-2 человека концевых, отрицательно заряженных остатков сialовых кислот или при биосинтезе IL-2 в присутствии ингибиторов гликозилирования наблюдалось смещение изоэлектрической точки в сторону более щелочных значений pI (pI = 8,2) и образование только одного

биологически активного продукта. Кроме того, при характеристике тем же методом заряда IL-2, полученного от лейкоэмических клеток Jurkat, оказалось, что почти вся активность фокусировалась в одном пике с той же самой изоэлектрической точкой ($pI = 8,2$).

Электрофоретический анализ в присутствии додецилсульфата натрия показывает, что IL-2, продуцируемый нормальными лимфоцитами миндалин или клетками линии Jurkat, гомогенен по размеру. В невосстанавливающих условиях молекулярная масса биологически активного продукта составляет 14 500 дальтон. Таким образом, человеческий IL-2 гомогенен по размеру и заряду, причем эти молекулярные характеристики идентичны для IL-2, продуцируемого нормальными лимфоцитами и трансформированной Т-клеточной линией. Несмотря на то что эти данные выглядят обнадеживающими, все же не следует считать доказанным, что за биологическую активность, приписываемую IL-2, отвечает лишь один полипептид. Возможно, для IL-2 характерна микрогетерогенность, прежде всего по остаткам нейтральных аминокислот, которую не удалось обнаружить методами гель-фильтрации, изоэлектрофокусирования и электрофореза в полиакриламидном геле.

О наличии микрогетерогенности свидетельствуют, в частности, иммунохимические данные. Одно из моноклональных антител (IgG_{2a}, обозначенные DMS-3), полученных недавно к IL-2 линии клеток Jurkat, связывает только 50 % биологической активности IL-2, присутствующей в кондиционированной среде клеток Jurkat (К. А. Smith, неопубликованные данные). Поэтому, хотя почти весь IL-2, продуцируемый клетками Jurkat, при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия мигрирует в виде одной полосы и гомогенен по результатам изоэлектрофокусирования, все же вполне возможно, что имеется не один полипептид, обладающий биологической активностью IL-2. Подобные результаты говорят о том, что на данном этапе исследований следует проявлять большую осторожность, приписывая биологическую активность IL-2 единственному полипептиду.¹

21.1.3.3. Дальнейшие перспективы

Проведенные до настоящего времени исследования показывают, что в основе ярко выраженной специфичности IL-2 к клетке-мишени и действия его *in vitro* в очень низких концентрациях лежит гормоноподобный механизм. Нам еще предстоит установить, имеются ли отличные друг от друга, но обладающие высокой степенью гомологии молекулы IL-2, лишь немного различающиеся по сродству к субпопуляциям Т-клеток. Учитывая данные, накопленные о других полипептидных гормонах и факторах роста, такую возможность исключить нельзя. Кроме того, в большинстве случаев при биохимическом выделении IL-2 тестирование биологической активности проводили с использованием клонированных линий мышинных цитолитических Т-клеток или неклонированных

¹ Строение IL-2 человека было определено в 1983 г. по структуре кодирующего его гена Т. Танигучи и др. [89] (обзоры см. [90, 91]). Зрелый IL-2 содержит 133 аминокислотных остатка. Заметной гомологии с какими-либо другими белками, в частности интерферонами, не наблюдается. Молекула IL-2 содержит одну углеводную цепь при Thr-3, в состав которой входит спаловая кислота. Активная конформация молекулы поддерживается единственной дисульфидной связью. Вторичная структура IL-2 более чем на 50% представлена α -спиралью [92]. В геноме имеется лишь одна копия гена IL-2, локализованная на хромосоме 4 [93]. Поиск активного центра молекулы IL-2, взаимодействующего с рецептором клетки-мишени, показал, что для связывания прежде всего необходимы фрагменты, расположенные на N-конце молекулы [92]. IL-2 мыши и быка оказались по структуре очень близки IL-2 человека: гомология аминокислотных последовательностей составляет более 60% [94, 95]. — *Прим. перев.*

линий человеческих Т-клеток. Еще предстоит проверить гетерогенность рецепторов IL-2. Например, уже очевидно, что существуют различия между рецепторами IL-2 у различных животных, поскольку радиоактивно меченный IL-2 человека имеет в четыре раза более высокое сродство к человеческим лимфоцитам, чем к мышинным [39]. Моноклональные антитела, анти-Tас, которые способны нейтрализовать биологическую активность IL-2 человека, полностью предотвращают связывание радиоактивно меченного IL-2 с человеческими, но не с мышинными клетками [45].

Учитывая вышесказанное, на основании завершенных к настоящему времени экспериментов можно сделать вывод о том, что лимфоциты общаются между собой, секретируя полипептиды, которые по свойствам аналогичны гормонам и нейромедиаторам. Другими словами, можно рассматривать лимфоциты, прежде всего Т-клетки, как разобщенную, циркулирующую железу. Степень роста клонов Т-клеток является одним из параметров, определяющих уровень иммунного ответа, а также служащих клеточной основой по меньшей мере одной составляющей иммунологической памяти (каждое повторное введение антигена приводит в результате роста клеточных клонов к увеличению числа антиген-специфических клеток). Поэтому лимфокины, как лимфоцитотропные гормоны, играют центральную роль, обеспечивая целостность нашей иммунной системы.

Следует как можно скорее, насколько это возможно для каждого лимфокина, исключить из нашего научного словаря термин *фактор*, так как этот термин ничего не говорит о механизме действия. Напротив, термин *гормон* несет в себе ясный физиологический смысл. Гормоны обладают выраженной индивидуальностью, абсолютной специфичностью по отношению к клетке-мишени и действуют при низких концентрациях. Они выделяются в ответ на изменения внешней среды, и в большинстве случаев их секреция регулируется по принципу обратной связи. Кроме того, тот факт, что взаимодействие некоторых лимфокинов с клетками-мишенями опосредуется специфическими рецепторами, свидетельствует о наличии пострецепторных механизмов, обуславливающих биологический эффект. Все эти свойства лимфокинов намечают будущие направления наших исследований. Изучение регуляции биосинтеза IL-2, идентификация его физиологических антагонистов, а также агонистов и антагонистов рецептора IL-2 представляют собой перспективные области будущих исследований. Далее, изучение механизма передачи митотического сигнала с клеточной мембраны в ядро расширяет наши представления о регуляции роста эукариотических клеток, что может иметь более общее значение и быть применимым не только к иммунологии, но и к другим областям биологии.

21.1.4. Дифференцировка Т-клеток, обусловленная лимфокинами

В результате разработки в конце 60-х годов методов тестирования цитотоксического действия Т-клеток [46, 47], а затем, в начале 70-х, — методов получения *in vitro* антиген-специфического ответа со стороны цитотоксических Т-лимфоцитов [48] появилась возможность использования клеточных систем для проверки влияния лимфокинов на функциональную активность цитотоксических Т-клеток. Вскоре стало очевидным, что для развития максимальной цитотоксической активности в смешанных культурах лимфоцитов необходимо присутствие как макрофагов, так и нецитолитических хелперных Т-клеток. Почти одновременно с обнаружением фактора роста Т-клеток было показано, что Т-хелперы можно заменить кондиционированной средой, полученной от стимулированных нормальных мононуклеарных клеток [49]. Когда возникла концепция о функ-

циональной взаимосвязи IL-1 и IL-2 и когда выяснилось, что присутствие этих лимфокинов обязательно для роста клонов Т-клеток, было высказано предположение, что секретируемая Т-хелперами активность, называемая *хелперным фактором киллеров* (КХФ, КНФ) или *фактором, индуцирующим цитотоксические клетки*, обеспечивается суммарной рост-стимулирующей активностью IL-1 и IL-2.

В ходе этих исследований, впоследствии подтвержденных и углубленных исследованием предшественников цитолитических Т-клеток (ПЦТК) с помощью метода лимитирующих разведений и изучения цитолитической активности клонированных лимфоцитов [60], не было получено данных, указывающих на присутствие какого-либо фактора, влияющего на дифференцировку цитолитических Т-клеток. Оглядываясь, однако, назад, нетрудно увидеть, что эти данные не исключали существования фактора дифференцировки, необходимого для появления функционально активных цитолитических Т-клеток, поскольку во всех упомянутых исследованиях использовались неочищенные лимфокины.

Опубликованные недавно результаты работ Раулета и Бевана [51] и Кэйеда и др. [52] показывают, что вывод об отсутствии цитотоксического фактора дифференцировки (ЦФД, CDF), возможно, был преждевременным. Раулет и Беван [51], используя в качестве источника IL-2 кондиционированную среду не от нормальных клеток, а от стимулированной лектином Т-клеточной гибридомы, обнаружили, что в отсутствие вспомогательных клеток $\text{Lyt } 2^+$ -ПЦТК пролиферируют, но не дифференцируются в цитолитические клетки-эффекторы. Цитолитическая активность появлялась лишь после добавления кондиционированной среды от нормальных клеток. Из этих данных был сделан вывод, что в супернатанте от Т-клеточной гибридомы нет фактора, необходимого для дифференцировки ЦТЛ (CTL), продуцируемого нормальными моноклеарными клетками. Чтобы доказать существование и изучить свойства ЦФД, требуются дальнейшие исследования, но уже сейчас имеет смысл критически оценить ход рассуждений, имевших место в этом случае. Наличие в клеточном супернатанте одной измеряемой активности не исключает присутствия других активностей, действующих на популяцию клеток-мишеней.

Факторы дифференцировки, необходимые для образования функционально активных хелперных и супрессорных Т-клеток, еще не известны. Однако, если будет доказано участие ЦФД в дифференцировке цитолитических Т-лимфоцитов, поиск новых факторов дифференцировки может стать в будущем важным направлением исследований. Как будет ясно из последующих разделов, уже имеются данные о существовании фактора(ов), участвующего(их) в дифференцировке В-клеток.

21.2. Лимфокины и В-клеточный иммунный ответ

21.2.1. Исторический очерк

Вскоре после того, как Мишел и Даттон [53] разработали 15 лет назад методы культивирования клеток, с помощью которых можно было получать антителообразующие клетки *in vitro*, были проведены эксперименты, показавшие, что для развития В-клеточного ответа необходимы Т-лимфоциты [54]. Были сделаны попытки выяснить, каким образом Т-лимфоциты способствуют возникновению антителообразующих клеток. В результате было сделано предположение, что Т-клетки можно заменить супернатантами от активированных лектинами (или антигенами) Т-клеток [55]. Поскольку подобные супернатанты действительно обладали способностью заменять Т-лимфоциты, появилась гипотеза

теза о существовании фактора, заменяющего Т-клетки (ТЗФ, TRF). На основании ранних данных о том, что для оптимального ответа нужно через 48—72 ч. после начала культивирования добавлять содержащий ТЗФ супернатант [56—59], было высказано предположение, что «поздно действующий» ТЗФ дает сигнал, требующийся для дифференцировки В-бластов в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины. Значительно меньше внимания уделялось пролиферации В-клеток, следующей за их активацией антигеном. Объяснялось это главным образом тем, что конечный этап практически всех В-клеточных тест-систем включал определение клеток, образующих бляшки (БОК). Кроме того, вследствие недостаточного развития методов удаления макрофагов не была изучена роль макрофагов в В-клеточном ответе.

Еще три года назад в качестве удобного источника препаратов В-лимфоцитов, не содержащих Т-клеток, использовались спленоциты бестимусной (*nu/nu*) мыши [58]. Многочисленные исследования показали, что у этих животных отсутствуют зрелые, функционально активные Т-клетки. Поэтому к спленоцитам бестимусной мыши добавляли антиген (гетерологичные эритроциты), кондиционированную среду, содержащую ТЗФ, и через 4—5 дней культивирования подсчитывали число БОК. Следует также отметить, что до последнего времени для получения *in vitro* антителообразующих клеток (АОК) приходилось культивировать клетки в условиях, весьма далеких от физиологических; плотность спленоцитов в культуре была очень высокой (10^7 клетка/мл), а ответ наблюдался лишь при добавлении некоторых партий сыворотки плода коровы. Главным образом благодаря разработке Исковым и др. [60, 61] среды, не содержащей сыворотки, и появлению метода лимитирующих разведений, позволяющего фиксировать уровень Т-клеточной помощи и число макрофагов, удалось выяснить, что одним из критических параметров является число хелперных Т-клеток: именно это обуславливало необходимость создания высокой плотности клеток и подбора партий сыворотки [62].

Кроме того, было обнаружено, что в спленоцитах бестимусной мыши есть клетки, отвечающие на IL-2 [63] и способные при получении соответствующего активирующего сигнала дифференцироваться в зрелые цитолитические и хелперные Т-клетки [63, 64]. С установлением этих факторов стало очевидным, что эксперименты, предпринятые для определения активности ТЗФ, могли на самом деле демонстрировать вызываемый IL-2 клональный рост Т-хелперов. На основе этих данных в сочетании с данными о том, что пролиферация и дифференцировка Т-клеток контролируются лимфокинами, были разработаны методы, с помощью которых можно было обнаруживать и характеризовать лимфокины, участвующие в В-клеточном иммунном ответе.

Как и при выяснении роли отдельных лимфокинов в Т-клеточном ответе, основная сложность работы с В-клеточными системами состоит в том, что доступные источники лимфокинов (как правило, это кондиционированная среда от стимулированных лектинами лимфоцитов) содержат сложную смесь разнообразных молекул. Кроме того, очень непросто получить гомогенную популяцию В-клеток без примесей Т-лимфоцитов, что сделало бы возможным однозначную интерпретацию результатов.

21.2.2. Фактор роста В-клеток

В течение последних двух лет было опубликовано несколько сообщений о том, что В-клеточная пролиферация вызывается фактором роста В-клеток (BCGF). Возможность поддерживать длительную пролиферацию культур человеческих [65] и мышиных [66] В-лимфоцитов с помощью кондиционированной

среды от стимулированных моноклеарных клеток явилась первым свидетельством роли растворимых факторов в пролиферации В-клеток. Как и в случае поддерживаемого кондиционированной средой роста Т-клеток, длительная пролиферация В-лимфоцитов не требует повторного воздействия антигена на иммуноглобулиновые рецепторы. Этот факт убедительно свидетельствует о том, что митоз В-клеток запускается независимым от антигенного стимула сигналом(ами). Несмотря на первые обнадеживающие эксперименты, длительно поддерживаемые культуры и клоны В-клеток не получили широкого распространения главным образом потому, что не были определены оптимальные условия роста В-лимфоцитов. Кроме того, большинство исследователей столкнулось с проблемой преимущественного роста в культурах Т-клеток, особенно если в качестве источника фактор роста В-клеток применялась кондиционированная среда, содержащая IL-2.

Для того чтобы компенсировать отсутствие стабильных, клонированных линий В-лимфоцитов, в качестве клеток-мишеней при определении фактора роста В-клеток стали использовать высокоочищенные нормальные В-клетки или трансформированные В-клетки. В тест-системе на этот фактор, которую разработали Ховард и др. [67], использовались мышинные спленоциты, из которых были удалены Т-клетки. Удаление Т-клеток проводили обработкой *in vivo* анти timoцитной сывороткой и последующим комплементзависимым лизисом оставшихся Т-лимфоцитов *in vitro* в присутствии различных антител к специфическим поверхностным маркерам Т-клеток. Были удалены и прилипающие клетки, так что конечная популяция состояла на 98—99 % из клеток, имевших поверхностные иммуноглобулины. Для определения фактора роста В-клеток их культивировали при относительно низкой концентрации ($2,5 \cdot 10^5$ клетка/мл) с различными разведениями кондиционированной среды, предположительно содержащей данный фактор. В отсутствие активирующих сигналов, затрагивающих поверхностные иммуноглобулины, пролиферативного ответа на фактор роста В-клеток не наблюдалось. Пролиферация не шла и при стимуляции клеток анти- μ -антителами в отсутствие фактора роста В-клеток. Таким образом, как и Т-лимфоциты, В-клетки необходимо было активировать, прежде чем они приобретали способность отвечать на фактор роста.

Аналогичные данные опубликовали и другие исследователи: Мурагучи и Фауци [68], которые использовали обогащенные В-клетками лимфоциты человека, активированные анти- μ -антителами или стафилококковым белком А; Форд и др. [69], также использовавшие обогащенные В-клетки человека, и Йошидзак и др. [70], изучавшие трансформированные клетки, полученные от больного с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ). Представляет интерес впервые описанный Фу и др. [71] факт, согласно которому только у тех больных ХЛЛ, в сыворотке которых присутствует моноклональный иммуноглобулин, есть трансформированные клетки, способные отвечать на фактор роста В-клеток. С помощью антиидиотипических антисывороток, а также Fab₂- и Fab-фрагментов было показано, что клетки ХЛЛ приобретают способность отвечать на исследуемый фактор только под действием двувалентных антиидиотипических антител [70].

Первые исследования, предпринятые для выяснения роли растворимых факторов в активации, пролиферации и дифференцировке В-клеток, где конечным этапом тестирования было выявление антителообразующих клеток, показали, что в культуре обязательно должен содержаться IL-2 [72]. Эти данные расценили как подтверждение непосредственного воздействия IL-2 на В-клетки, поскольку в начале культивирования бралась высокоочищенная популяция В-лимфоцитов. Однако позднее с помощью Т-клеточных гибридом, продуцирую-

щих только фактор роста В-клеток, IL-2 или фактор дифференцировки В-клеток, было обнаружено, что IL-2 не нужен ни для пролиферации В-клеток, ни для их дифференцировки в АОК [73]. Кроме того, абсорбция IL-2 активированными Т-клетками никак не сказывалась на пролиферации В-клеток, в то время как истощение супернатантов активированными анти- μ В-лимфоцитами приводило к исчезновению активности фактора роста В-клеток при сохранении активности фактора роста Т-клеток. Таким образом, было показано, что фактор роста В-клеток и IL-2 представляют собой разные структуры. Помимо этого была продемонстрирована абсорбция фактора роста В-клеток активированными В-лимфоцитами — факт, подтверждающий, что взаимодействие лимфокинов с клетками опосредуется высокоаффинными центрами связывания, которые отличаются очень высокой специфичностью по отношению к определенному лимфокину. Рассмотренные данные в сочетании с данными о том, что IL-2 проявляет активность в очень низких концентрациях, объясняют полученные ранее результаты, согласно которым IL-2 необходим для развития В-клеточного ответа: IL-2 вызывает рост клонов оставшихся в В-клеточной популяции Т-лимфоцитов, а те в свою очередь способствуют образованию АОК путем секреции лимфокинов, специфичных к В-клеткам.

Клетки-продуценты фактора роста В-клеток не идентифицированы достоверно, хотя секреция фактора роста В-клеток тимусными лейкоэмическими клетками мыши [67], Т-клеточными гибридами человека [73] и клонированными IL-2-зависимыми Т-клетками человека [74] служит веским доводом в пользу его Т-клеточного происхождения. Биохимическое изучение этого фактора еще только началось, но уже первые результаты показали заметное сходство в свойствах человеческого фактора роста В-клеток и IL-2 [74]. По данным гель-фильтрации оба лимфокина имеют мол. массу около 20 кДа. Кроме того, эти две активности не удается разделить хроматофокусированием. Подобное сходство говорит о том, что можно ожидать аминокислотной гомологии между этими двумя ростовыми факторами человека. Напротив, по данным Ховард и др. [67], мышинный фактор роста В-клеток удается отделить от IL-2 гель-фильтрацией: кажущаяся мол. масса фактора роста составляет 16,5—18,5, а IL-2 — 30—35 кДа.

Недавно Йошидаки и др. [74], а также Окада и др. [73] опубликовали данные о существовании двух различных факторов роста В-клеток у человека. Один из них, продуцируемый нормальными клонированными IL-2-зависимыми Т-клетками, по результатам гель-фильтрации имеет мол. массу 50 кДа. При рехроматографии в присутствии 4М мочевины мол. масса уменьшается до 19 кДа. Нормальные периферические мононуклеарные клетки крови при стимуляции ФГА и ФМА секретируют ту же самую молекулу с мол. массой 50 кДа, а также другой лимфокин, который элюируется в объеме, соответствующем 17 кДа. По-видимому, больший интерес, чем гетерогенность по размеру молекулы, представляет тот факт, что действие двух этих факторов на рост В-клеток синергично. Возможно, данное наблюдение поможет объяснить затруднения, с которыми столкнулось большинство исследователей при попытке поддержать длительный рост В-лимфоцитов. Поэтому дальнейшие работы, направленные на изучение молекулярных свойств В-клеточных факторов роста, механизма их взаимодействия с активированными В-клетками и механизмов, обеспечивающих митоз В-лимфоцитов, открывают возможность широкого изучения и применения антиген-специфических клонов нормальных В-клеток. Такие клетки будут очень полезным инструментом, облегчающим получение гибридом, а также будут использоваться в качестве клеток-мишеней для дальнейшего изучения регуляции и дифференцировки В-лимфоцитов на клеточном, молекулярном и генетическом уровнях.

21.2.3. В-клеточные факторы дифференцировки

С момента обнаружения в 1972 г. Шимпл и Веккером [56] «поздно действующего» ТЗФ считалось, что конечный этап дифференцировки пролиферирующих В-бластов в иммуноглобулин-секретирующие плазматические клетки протекает под воздействием продуцируемого Т-клетками лимфокина(ов). Однако исследование молекулярных характеристик ТЗФ и механизма его действия на пролиферирующие В-клетки развивались медленно. Заметный интерес к роли лимфокинов в дифференцировке В-лимфоцитов возник в последние годы. Возможность исследования этих молекул была обусловлена появлением более совершенных методов культивирования клеток, успехами в изучении генетических основ образования иммуноглобулинов и перегруппировки генов их тяжелых цепей и, наконец, правильной оценкой полученных ранее данных, в свое время неправильно интерпретированных из-за загрязнения культур Т-клетками.

Поскольку зрелые В-лимфоциты экспрессируют мембранный IgM, очевидно, что перегруппировка генов, необходимая для транскрипции и трансляции мембрано-связанной формы μ -цепей и легких цепей, уже произошла. Если справедливо предположение о том, что активация В-клеток обусловлена связыванием антигена с антигенсвязывающими участками мембранного IgM, и если активация приводит к экспрессии рецепторов фактора роста В-клеток, тогда ТЗФ или В-клеточные факторы дифференцировки должны контролировать процессы, которые в конце концов приводят к морфологическим изменениям, характерным для плазматических клеток, переключению биосинтеза с мембранной формы μ -цепи на секреторную форму и последующему переключению на биосинтез других классов и подклассов тяжелых цепей. Пока получены только предварительные данные, но похоже, что все эти процессы регулируются семейством близких по свойствам, но все-таки различных факторов дифференцировки В-клеток (ФДВК, BCDF).¹

В связи с отсутствием доступных антиген-специфических клонированных линий нормальных В-клеток, зависимых от фактора роста, в последнее время исследователи, работающие с ФДВК, обратились к линиям раковых или трансформированных вирусом Эпштейна — Барр В-клеток как к источнику гомогенных клеток-мишеней для определения ФДВК. Хотя следует соблюдать осторожность при оценке физиологической роли лимфокинов на основании таких экспериментов, в которых клетками-мишенями служат трансформированные лимфоциты, такой подход позволяет избежать сложностей, с которыми приходится сталкиваться при использовании нормальных В-лимфоцитов, часто загрязненных другими типами клеток.

Недавно Пэйдж и др. [75] опубликовали данные о применении раковых клеток для определения ФДВК, функция которых, видимо, заключается в переключении механизма сплайсинга РНК, что необходимо для изменения соотношения синтезируемых мембранной и секретируемых μ -цепей. Было показано, что при добавлении супернатантов, полученных от специфических, стимулированных антигеном клонированных Т-хелперов, к клеткам мышиной линии WENI-279.1, имеющим на поверхности IgM, в течение 24 ч происходит пере-

¹ Японскими учеными был клонирован ген дифференцировочного фактора (BSF-2, или BCDF), вызывающего секрецию антител преактивированными В-клетками человека [105]. Полипептидная цепь белка состоит из 184 аминокислотных остатков. Данный лимфокин имеет заметную гомологию только с фактором, стимулирующим рост колоний гранулоцитов человека (G-CSF). Ростовый активностью этот лимфокин не обладает. — *Прим. перев.*

ключение биосинтеза μ -цепи с мембранной на секреторную форму. Кроме того, за этим переключением следовало увеличение доли IgM-секретирующих клеток. Поскольку величина изменений зависела от количества добавленного супернатанта, подобная система тестирования пригодна для идентификации и выделения продуцируемого Т-лимфоцитами ФДБК. Следует отметить, что началу активной секреции должен предшествовать посттрансляционный процессинг μ -цепи, который можно проследить по появлению внутриклеточных μ -цепей размером 70 кДа. Этот процесс также может зависеть от ФДБК.

В других опытах в качестве клеток-мишеней факторов дифференцировки, осуществляющих переключение биосинтеза с мембранного на секретируемый IgM, использовались свежeweделенные раковые В-клетки мыши или человека. Айсаксон и др. [76] с помощью пассируемых *in vivo* клеток BCL₁, напоминающих человеческие клетки ХЛЛ, обнаружили, что супернатанты от культур клеток селезенки, стимулированных лектином или аллоантигеном, содержат факторы дифференцировки, вызывающие секрецию IgM. Используя антиидиотипическую антисыворотку к идиотипу BCL₁-клеток, удалось показать, что именно BCL₁-клетки, а не нормальные В-лимфоциты, загрязняющие культуру, являлись мишенями в данной тест-системе. Аналогичные результаты опубликовали Йошидаки и др. [70], работавшие с человеческим ХЛЛ-клетками, полученными от больного, у которого в сыворотке присутствовал моноклональный IgM. Использованием антиидиотипической антисыворотки для активации ХЛЛ-клеток было обнаружено, что частично очищенная кондиционированная среда, полученная стимуляцией лимфоцитов миндалины лектином, содержала молекулы размером 20 кДа, вызывающие секрецию IgM и небольших количеств IgG, несущих специфический идиотип.

В настоящее время неясно, существует ли только один или несколько различных факторов дифференцировки В-клеток — таким образом, что все этапы дифференцировки в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины, находятся под полным контролем продуцируемых Т-клетками лимфокинов. Не исключено, что некоторые из сигналов, вызывающих секрецию тяжелой цепи определенного класса, передаются внутриклеточно и не зависят от Т-клеток. Вполне возможно, что по мере прохождения клеткой различных стадий дифференцировки на поверхности появляются рецепторы, специфичные к определенному фактору дифференцировки В-клеток. В этом случае фенотипические характеристики клеток-мишеней, используемых для тестирования этого фактора, могут определить молекулярные свойства изучаемого ФДБК. Особенно полезными при изучении свойств ФДБК и при проверке предположения о существовании нескольких В-клеточных факторов дифференцировки могут быть трансформированные В-клеточные линии, имеющие определенный фенотип поверхностного иммуноглобулина. Например, Мурагучи и др. [77] показали, что кондиционированная среда от стимулированных лектинами мононуклеарных клеток вызывает у трансформированной вирусом Эпштейна — Барр линии человеческих В-клеток (CESS), имеющих поверхностный IgG, секрецию исключительно IgG. Остается невыясненным, аналогичен ли ФДБК, выявляемый в данной тест-системе, фактору дифференцировки, описанному Пэйджем и др. [75] и вызывающему секрецию IgM у клеток, имеющих поверхностный IgM. В принципе этот вопрос можно было бы решить, поскольку клетки CESS способны абсорбировать из супернатанта молекулы с активностью, обуславливающей секрецию IgG. И в этом случае эксперименты по адсорбции факторов представляют определенный интерес, так как дают основание предполагать, что механизм взаимодействия ФДБК с В-клетками аналогичен взаимодействию IL-2 с IL-2-специфическими рецепторами. Поэтому можно надеять-

ся, что удастся изучить опосредуемую рецепторами специфичность различных ФДВК.

Новые важные данные, полученные с помощью CESS-IgG-системы, недавно опубликовали Кэйда и др. [52]. Было обнаружено, что линия аллоантиген-специфических клонированных хелперных Т-клеток человека продуцирует ФДВК, вызывающий секрецию IgG клетками CESS. Активность, продуцируемая Т-клеточными клонами, была в 1000 раз выше активности ФДВК, содержащейся в супернатанте стимулированных лектином мононуклеарных клеток человека. При гель-фильтрации супернатанта Т-клеточных клонов ФДВК элюировался вместе IL-2 (20 кДа), однако активность ФДВК можно было избирательно абсорбировать клетками CESS, в то время как с помощью IL-2-зависимых цитолитических Т-клеток удавалось абсорбировать IL-2, но не ФДВК. Эти результаты выглядят обнадеживающими, так как клетки CESS дают нам возможность надежно определить рассматриваемый ФДВК, а клонированные Т-клетки способны продуцировать фактор в количествах, достаточных для биохимических исследований.

Недавно были опубликованы данные, указывающие на то, что специфические Т-клетки могут продуцировать В-клеточные дифференцировочные факторы, определяющие, какой класс и субкласс тяжелой цепи будут в конечном итоге экспрессировать В-клетки. Предложено две модели, объясняющие молекулярный механизм переключения биосинтеза В-лимфоцитами. Согласно первой из них, этот процесс является вероятностным, и клетки переключаются на секрецию нового изотипа случайным образом. В таком случае вероятность продуктивной рекомбинации с определенной С-областью зависит от таких параметров, как расстояние от гена C_H или от числа и типа участков, по которым может происходить рекомбинация. Вторая возможность заключается в прямой индукции определенного изотипа факторами дифференцировки, имеющими Т-клеточное происхождение. Данные в пользу специфического переключения изотипа Т-клетками получили Айксон и др. [78]. В качестве индикаторных клеток использовались обогащенные нормальные В-лимфоциты мыши, активированные ЛПС. Было показано, что Кон А индуцирует образование Т-клеточной гибридомой и двумя IL-2-зависимыми Т-клеточными линиями факторов, вызывающих преимущественную секрецию IgG₁ В-клетками, не имеющими поверхностного IgG. Напротив, супернатанты других Т-клеточных гибридом и Т-клеточных клонов либо не содержали ФДВК, либо вызывали секрецию IgM.

Аналогичные, очень убедительные данные, говорящие о регуляции Т-клетками экспрессии изотипов В-лимфоцитами, недавно опубликовали Кийоно и др. [79]. Клоны мышинных Т-хелперов, специфичных к бараньим эритроцитам (БЭ), были выведены из лимфоцитов пейеровых бляшек перорально иммунизированных животных. После начального периода культивирования (2—3 недели) в присутствии БЭ и частично очищенного IL-2 методом лимитирующих разведений было получено более 200 клонов, из которых 63 (около 30 %) обладали хелперной активностью. Двадцать один клон был тщательно изучен: выяснилось, что все эти клоны способствуют образованию значительного числа БОК, секретирующих IgA. Независимо от того, были ли В-клетки взяты от примированной или непримированной мыши, Т-хелперные клоны стимулировали образование одного и того же числа IgA БОК. Кроме того, IgA БОК получались как из В-клеток селезенки, так и из В-лимфоцитов пейеровых бляшек. Рассмотренные выше данные свидетельствуют о том, что в случае IgA-ответа центральная роль в экспрессии изотипа принадлежит Т-хелперам, причем ни анатомическая локализация В-клеток, взятых для тестирования, ни их иммунологический статус (примированные или непримированные) не имеют существенного значения.

Для решения вопроса о существовании изотип-специфических ФДВК в проведенном исследовании заслуживает внимания тот факт, что растворимые факторы, продуцируемые специфическими, стимулированными антигеном клонами Т-хелперов, вызывали преимущественное образование БОК секретирующих IgA. В наше время интенсивно исследуются также Т-клеточные факторы, вызывающие экспрессию IgE [80].¹

Заключение и дальнейшие перспективы

В отличие от IL-1 и IL-2, участвующих в пролиферативном ответе Т-клеток, биологическое и биохимическое изучение лимфокинов, вызывающих пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, только начинается. Все же из рассмотренных выше работ уже можно сделать некоторые выводы, которые, с одной стороны, требуют подтверждения, а с другой — служат хорошей основой для дальнейших экспериментов. Кажется вполне вероятным, что пролиферация, обеспечивающая клональный рост В-клеток, также как и Т-клеток, вызывается специфичными к В-лимфоцитам факторами роста. Кроме того, как и в случае Т-клеток, факторы роста В-клеток скорее всего взаимодействуют со специфическими рецепторами, имеющимися только на активированных антигеном В-клетках. По сравнению с дифференцировкой Т-лимфоцитов дифференцировка В-лимфоцитов отличается большей сложностью и в нее могут быть вовлечены несколько сходных, но различных ФДВК. Возможно, что переключение биосинтеза с мембранной формы μ -цепи на секреторную и последующее переключение на другой изотип тяжелой цепи в значительной степени, если не полностью, зависят от Т-клеточных факторов. Поэтому, прежде чем пытаться выделить и охарактеризовать какой-либо лимфокин, необходимо направить усилия на развитие надежных систем тестирования подобных факторов и поиск подходящих источников для их получения. Хотелось бы надеяться, что эти эксперименты не займут много времени и позволят перейти к следующему этапу исследований — изучению механизма действия каждого лимфокина и их роли *in vivo*. Только тогда мы будем достаточно подготовлены к тому, чтобы использовать эти многообещающие пептиды лимфоцитарного происхождения для диагностики и терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bach J. F., ed. Immunology, John Wiley and Sons, New York, 1978.
2. DeMaeyer E. Introductory statement on interferon. In: Biochemical Characterization of Lymphokines, ed. by A. deWeck, F. Kristensen, and M. Landy, p. 313. Academic Press, New York, 1980.

¹ Хонджо [101] и независимо Ли и др. [102] был клонирован ген лимфокина, ответственного за индукцию IgG 1 мыши. Этот лимфокин (BCDF- γ или BSF-1; новое название IL-4), продуцируемый Т-лимфоцитами, представляет собой гликопротеин, состоящий из 120 аминокислотных остатков. Аминокислотная последовательность IL-4 имеет некоторую гомологию с мышинными $\text{Iln-}\gamma$ и фактором, стимулирующим рост колоний гранулоцитов/макрофагов. IL-4 способен также проявлять активность В-клеточного ростового фактора (BCGF-I). Таким образом, один и тот же лимфокин может принимать участие в разных стадиях В-клеточного ответа, играя роль как ростового, так и дифференцировочного фактора. Клонирован и ген IL-4 (BSF-1) человека, гомологичного по структуре мышинному аналогу [103]. Совмещение одной молекулой функций ростового и дифференцировочного фактора было подтверждено на примере Т-замещающего фактора мыши (TRF; новое название IL-5), обладающего также свойствами В-клеточного ростового фактора II (BCGF II, 100). TRF представляет собой гликопротеин, состоящий из 112 аминокислотных остатков. Короткие фрагменты белковой цепи имеют гомологию с мышинными интерлейкином 3, фактором, стимулирующим рост колоний гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), и интерфероном- γ . — *Прим. перев.*

3. Smith K. A., Gillis S., Baker P. E. The role of soluble factors in the regulation of T-cell immune reactivity. In: *The Molecular Basis of Immune Cell Function*, ed. by J. G. Kaplan, pp. 223—237. Elsevier/North Holland Biomedical Press, The Netherlands, 1979.
4. Smith K. A., Ruscetti F. W. T-cell growth factor and the culture of cloned functional T-cells. In: *Advances in Immunology*, ed. by H. Kunkel and F. Dixon, pp. 137—175. Academic Press, New York, 1981.
5. Nowell P. C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Res.* 20, 462—466 (1960).
6. Kasakura S., Lowenstein L. A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leucocyte cultures, *Nature*, 208, 894—896 (1965).
7. Gordon J., McLean L. D. A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro, *Nature*, 208, 795—797 (1965).
8. Bach F. H., Alter B. J., Solliday S., Zoschke D. C., Janis M. Lymphocyte reactivity in vitro, *Cell. Immunol.*, 1, 219—227 (1970).
9. Gery I., Gershon R. K., Waksman B. H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell, *J. Exp. Med.*, 136, 128—142 (1972).
10. Gery I., Waksman B. H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediators, *J. Exp. Med.*, 136, 143—155 (1972).
11. Morgan D. A., Ruscetti F. W., Gallo R. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrows, *Science*, 193, 1007—1009 (1976).
12. Gillis S., Smith K. A. Long-term culture of cytotoxic T-lymphocytes, *Nature*, 268, 154—156 (1977).
13. Nabholz M., Engers H. D., Collavo D., North M. Cloned T-cell lines with specific cytolytic activity, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 81, 176—187 (1978).
14. Baker P. E., Gillis S., Smith K. A. Monoclonal cytolytic T-cell lines, *J. Exp. Med.*, 149, 273—278 (1979).
15. Schreier M. H., Tees R. Clonal induction of helper T-cells: Conversion of specific signals into nonspecific signals, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 61, 227—237 (1980).
16. Gillis S., Ferm M. M., Ou W., Smith K. A. T-cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity, *J. Immunol.*, 120, 2027—2032 (1978).
17. Oppenheim J. J., Northoff H., Greenhill A., Mathieson B. J., Smith K. A., Gillis S. Properties of human monocyte derived lymphocyte activating factor (LAF) and lymphocyte derived mitogenic factor (LMF). In: *Biochemical Characterization of Lymphokines*, ed. by A. deWeck, pp. 399—404, Academic Press, New York, 1980.
18. Larsson E., Iscove N. N., Coutinho A. Two distinct factors are required for the induction of T-cell growth, *Nature*, 283, 664—666 (1980).
19. Smith K. A., Lachman L. B., Oppenheim J. J., Favata M. F. The functional relationship of the interleukins, *J. Exp. Med.*, 151, 1551—1556 (1980).
20. Shaw J., Caplan B., Paetkau V., Pilarski L. M., Delovitch T. L., McKenzie I. F. C. Cellular origins of costimulator (IL2) and its activity in cytotoxic T lymphocyte responses, *J. Immunol.*, 124, 2234—2239 (1980).
21. Farrar W. L., Mizel S. B., Farrar J. J. Participation of lymphocyte activating factor (interleukin 1) in the induction of cytotoxic T cell responses, *J. Immunol.*, 124, 1371—1377 (1980).
22. Smith K. A., Gillis S., Baker P. E., McKenzie D., Ruscetti F. W. T-cell growth factor-mediated T-cell proliferation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 332, 423—432 (1979).
23. Letter to the Editor. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors, *J. Immunol.*, 123, 2928 (1979).
24. Watson J., Mochizuti D. Interleukin 2: A class of lymphocyte growth factors, *Immunol. Rev.*, 51, 257—278 (1980).
25. Mizel S. Lymphokines in antibody and cytotoxic responses. In: *Lymphokines 6*, ed. by S. Mizel, p. XI, Academic Press, New York, 1982.
26. Rosenstreich D. L., Farrar J. J., Dougherty S. Absolute macrophage dependency of T lymphocyte activation by mitogens, *J. Immunol.*, 116, 131—139 (1976).
27. Oppenheim J., Mizel S., Meltzer M. Comparison of lymphocyte and mononuclear phagocyte derived mitogenic «amplification» factors. In: *Biology of the Lymphokines*, ed. by S. Cohen, E. Pick, and J. Oppenheim, pp. 291—310, Academic Press, New York, 1979.
28. Smith K. A., Gilbride K. J., Favata M. F. Interleukin-1-promoted interleukin-2 production, *Behr. Instit. Mitteil.*, 67, 4—11 (1980).
29. Mizel S. B. Studies on the purification and structure-function relationships of murine lymphocyte activating factor (Interleukin 1), *Mol. Immunol.*, 17, 571—577 (1980).
30. Smith K. S., Gilbridge K. J., Favata M. F. Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells, *Nature*, 287, 853—855 (1980).
31. Gillis S., Mizel S. B. T-cell lymphoma model for the analysis of interleukin 1-mediated T-cell activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1133—1137 (1981).

32. Maizel A. L., Mehta S. R., Haupt S., Franzini D., Lachman L. B., Ford R. J. Human T lymphocyte/monocyte interaction in response to lectin: Kinetics of entry into the S-phase, *J. Immunol.*, **127**, 1058—1064 (1981).
33. Mizel S. B., Mizel D. Purification to apparent homogeneity of murine interleukin 1, *J. Immunol.*, **126**, 834—837 (1981).
34. Gillis S., Crabtree G. R., Smith K. A. Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation, *J. Immunol.*, **123**, 1624—1631 (1979).
35. Gillis S., Crabtree G. R., Smith K. A. Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production. II. The effect on the in vitro generation of cytolytic T-cells, *J. Immunol.*, **123**, 1632—1637 (1979).
36. Gillis S., Henney C. S. The biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules, *J. Immunol.*, **126**, 1978—1984 (1981).
37. Gillis S., Gillis A. E., Henney C. S. Monoclonal antibody directed against interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **154**, 983—988 (1981).
38. Stadler B. M., Berenstein E. H., Siraganian R. P., Oppenheim J. J. Monoclonal antibody against human interleukin 2 (IL-2), *J. Immunol.*, **128**, 1620—1624 (1981).
39. Robb R. J., Munck A., Smith K. A. T-cell growth factor receptors: Quantitation, specificity and biological relevance, *J. Exp. Med.*, **154**, 1455—1474 (1981).
40. Smith K. A. T-cell growth factor, a lymphocytotropic hormone. In: *Proceedings of the 55th Nobel Symposium, Genetics of the Immune Response*, pp. 151—185, Plenum, New York, 1983.
41. Farrar J. J., Fuller-Farrar J., Simon P. L., Hilfiker M. L., Stadler B. M., Farrar W. L. Thymoma production of T-cell growth factor, *J. Immunol.*, **125**, 2555—2558 (1980).
42. Gillis S., Watson J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin-2-producing human leukemia T-cell line, *J. Exp. Med.*, **152**, 1709—1719 (1980).
43. Gillis S., Smith K. A., Watson J. D. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. II. Purification of a class of rat and human lymphokines, *J. Immunol.*, **124**, 1954—1962 (1980).
44. Robb R. J., Smith K. A. Heterogeneity of human T-cell growth factor due to glycosylation, *Mol. Immunol.*, **18**, 1087—1094 (1981).
45. Leonard W. J., Depper J. M., Uchiyama T., Smith K. A., Waldmann T. A., Greene W. C. A monoclonal antibody, anti-Tac, blocks the membrane binding and action of human T-cell growth factor, *Nature*, **300**, 267—269 (1982).
46. Brunner K. T., Manuel J., Cerottini J. C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs, *Immunology*, **14**, 181—196 (1968).
47. Manuel J., Rudolf H., Chapuis B., Brunner K. T. Studies of allograft immunity in mice, *Immunology*, **18**, 517—535 (1970).
48. Wagner H., Feldmann M. Cell mediated immune response in vitro. I. A new in vitro system for the generation of cell-mediated cytotoxic activity, *Cell. Immunol.*, **3**, 405—420 (1972).
49. Wagner H., Rollinghoff M. T — T-cell interactions during in vitro cytotoxic allograft responses, *J. Exp. Med.*, **148**, 1523—1538 (1978).
50. MacDonald H. R., Cerottini J. C., Ryser J. E., Maryanski J. L., Taswell C., Widmer M. B., Brunner K. T. Quantitation and cloning of cytolytic T-lymphocytes and their precursors, *Immunol. Rev.*, **51**, 93—123 (1980).
51. Raulet D. H., Bevan M. J. A differentiation factor required for the expression of cytotoxic T-cell function, *Nature*, **296**, 754—757 (1982).
52. Kaieda T., Okada M., Yoshimura N., Kishimoto S., Yamamura Y., Kishimoto T. A human helper T cell clone secreting both killer helper factor(s) and T cell-replacing factor(s), *J. Immunol.*, **129**, 46—51 (1982).
53. Mishell R., Dutton R. Immunization of normal mouse spleen cell suspensions in vitro, *Science*, **153**, 1004—1006 (1966).
54. Mosier D. E. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro, *Science*, **158**, 1573—1575 (1967).
55. Dutton R., Falkoff R., Hirst J., Hoffmann M., Kappler J., Kettman J., Lesley J., Vann D. Is there evidence for a non-antigen specific diffusible chemical mediator from the thymus-derived cell in the initiation of the immune response? In: *Progress in Immunology*, Vol. 1, ed. by B. Amos, pp. 355—367, Academic Press, New York, 1971.
56. Schimpl A., Wecker E. Replacement of T-cell function by a T-cell product, *Nature*, **237**, 15—17 (1972).
57. Schimpl A., Wecker E. Stimulation of IgG antibody formation in vitro by T-cell-replacing factor, *J. Exp. Med.*, **137**, 547—552 (1973).

58. Askonas B., Schimpl A., Wecker E. The differentiation function of T-cell replacing factor in nu/nu spleen cell cultures, *Eur. J. Immunol.*, 4, 164—169 (1974).
59. Schimpl A., Wecker E. A third signal in B-cell activation given by TRF, *Transplant. Rev.*, 23, 176—188 (1975).
60. Iscove N. N., Melchers F. Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 147, 923—933 (1978).
61. Iscove N. N., Guilbert L. J., Weyman C. Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol, *Exp. Cell Res.*, 126, 121—126 (1980).
62. Schreier M. H. The antibody response in vitro: Dissection of a complex system. In: *Lymphokines 2*, Vol. 2, ed. by Edgar Pick, pp. 31—61, Academic Press, New York, 1981.
63. Gillis S., Union N. A., Baker P. E., Smith K. A. The in vitro generation and sustained culture of nude mouse cytolytic T-lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 149, 1460—1479 (1979).
64. Stotter H., Rude E., Wagner H. T cell factor (interleukin 2) allows in vivo induction of T helper cells against heterologous erythrocytes in athymic (nu/nu) mice, *Eur. J. Immunol.*, 10, 719—722 (1980).
65. Sredni B., Sieckmann D., Kumagi S., House S., Green I., Paul W. E. Long-term culture and cloning of nontransformed human B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 154, 1500—1516 (1981).
66. Howard M., Kessler S., Chused T., Paul W. E. Long-term culture of normal mouse B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5788—5792 (1981).
67. Howard M., Farrar J., Hilfiker M., Johnson B., Tokatsu K., Hamaoka T., Paul W. E. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.*, 155, 914—923 (1982).
68. Muraguchi A., Fauci A. S. Proliferative responses of normal human B lymphocytes. Development of an assay system for human B cell growth factor (BCGF), *J. Immunol.*, 129, 1104—1108 (1982).
69. Ford R. J., Mehta S. R., Franzini D., Montagna R., Lachman L. B., Maizel A. L. Soluble factor activation of human B leukocytes, *Nature*, 294, 261—263 (1981).
70. Yoshizaki K., Nakagawa T., Kaieda R., Muraguchi A., Yamamura Y., Kishimoto T. Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by antiimmunoglobulins and T cell factors, *J. Immunol.*, 128, 1296—1301 (1982).
71. Fu S., Chiorazzi N., Kunkel H., Halper J., Harris S. Induction of in vitro differentiation and immunoglobulin synthesis of human leukemic B-lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 148, 1570—1578 (1978).
72. Swain S., Dennert G., Warner J., Dutton R. Culture supernatants of a stimulated T-cell line have helper activity that acts synergistically with interleukin 2 in the response of B-cells to antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2517—2521 (1981).
73. Okada M., Sakaguchi N., Yoshimura N., Hara H., Shimizu K., Yoshida N., Yoshizaki K., Kishimoto S., Yamamura Y., Kishimoto T. B cell growth factor (BCGF) and B cell differentiation factor (BCDF) from human T hybridoma: Two distinct kinds of BCGFs and their synergism in B cell proliferation, *J. Exp. Med.*, 157, 583—590 (1983).
74. Yoshizaki K., Nakagawa T., Fukunaga K., Kaieda T., Maruyama S., Kishimoto S., Yamamura Y., Kishimoto T. Characterization of human B cell growth factor (BCGF) from cloned T cells or mitogen-stimulated T cells, *J. Immunol.*, 130, 1241—1246 (1983).
75. Paige C. J., Schreier M. H., Sidman C. L. Mediators from cloned T helper cell lines affect immunoglobulin expression by B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4756—4760 (1982).
76. Isakson P. C., Pure E., Uhr J. W., Vitetta E. S. Induction of proliferation and differentiation of neoplastic B cells by anti-immunoglobulin and T-cell factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2507—2511 (1981).
77. Muraguchi A., Kishimoto T., Miki Y., Juritani T., Kaieda T., Yoshizaki K., Yamamura Y. T cell-replacing factor-(TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF, *J. Immunol.*, 127, 412—416 (1981).
78. Isakson P. C., Pure E., Vitetta E. S., Krammer P. H. T cell-derived B cell differentiation factor(s), *J. Exp. Med.*, 155, 734—748 (1982).
79. Kiyono H., McGhee J. R., Mosteller L. M., Eldridge J. H., Koopman W. J., Kearner J. F., Michalek S. M. Murine Peyer's patch T cell clones, *J. Exp. Med.*, 156, 1115—1130 (1982).
- 80-84. Hirashima J., Yodai J., Huff T., Ishizaka K. Formation of IgE-inducing factors by rat T-lymphocytes, *J. Immunol.*, 127, 1810—1816 (1981).

Литература к примечаниям переводчика

85. March C. J., Mosley B., Larsen A., Cerretti D. P., Braedt G., Price V., Gillis S., Henney C. S., Kronheim S. R., Grabstein K., Conlon P. J., Hopp T. P., Cosman D. Cloning,

- sequence and expression of two distinct human interleukin 1 complementary DNAs, *Nature*, 315, 641—648 (1985).
86. Lomedico P. T., Gubler U., Hellmann C. P., Dukovich M., Giri J. G., Pan Y. E., Collier K., Seminow R., Chua A. O., Mizel S. B. Cloning and expression of murine interleukin 1 cDNA in *Escherichia coli*, *Nature*, 312, 458—462 (1984).
 87. Furutani Y., Notake M., Yamayoshi M., Yamagishi J., Nomura H., Ohue M., Furuta R., Fukui T., Yamada M., Nakamura S. Cloning and characterization of the cDNAs for human and rabbit interleukin 1 precursor, *Nucleic Acids Res.*, 13, 5869—5882 (1985).
 88. Oppenheim J. J., Kovacs E. J., Matsushima K., Durum S. K. There is more than one interleukin 1, *Immunol. Today*, 7, 45—56 (1986).
 89. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka C., Kashima N., Yoshimoto R., Hamuro J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2, *Nature*, 302, 305—310 (1983).
 90. Robb R. J. Interleukin 2: the molecule and its function, *Immunol. Today*, 5, 203—209 (1984).
 91. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Hatakeyama M., Kashima N., Fuse A., Hamuro J., Nishi-Takaoka C., Yamada G. Molecular analysis of the interleukin-2 system, *Immunol. Rev.*, 92, 121—133 (1986).
 92. Cohen F. E., Kosen P. A., Kuntz I. D., Epstein L. B., Ciardelli T. L., Smith K. A. Structure-Activity Studies of Interleukin-2, *Science*, 234, 349—352 (1986).
 93. Seigel L. J., Harper M. E., Wong-Staal F., Gallo R. C., Nach W. G., O'Brien S. J. Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4g and feline chromosome B1, *Science*, 223, 175—178 (1984).
 94. Kashima N., Nishi-Takaoka C., Fujita T., Taki S., Yamada G., Hamuro J., Taniguchi T. Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs, *Nature*, 313, 402—404 (1985).
 95. Reeves R., Spies A. G., Nissen M. S., Buck C. D., Weinberg A. D., Barr P. J., Magnuson N. S., Magnuson J. A. Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3228—3232 (1986).
 96. Greene W. C., Depper J. M., Kronke M., Leonard W. J. The human interleukin-2 receptor: analysis of structure and function, *Immunol. Rev.*, 92, 29—48 (1986).
 97. Sharon M., Klausner R. D., Cullen B. R., Chizzonite R., Leonard W. J. Novel Interleukin-2 Receptor Subunit Detected by Cross-Linking Under High-Affinity Conditions, *Science*, 234, 839—863 (1986).
 98. Mittler R., Rao P., Olini G., Westberg E., Newman W., Hoffman M., Goldstein G. Activated human B cells display a functional IL 2 receptor, *J. Immunol.*, 134, 2393—2399 (1985).
 99. Habu S., Okumura K., Diamantstein T., Shevach E. M. Expression of interleukin 2 receptor on murine fetal thymocytes, *Eur. J. Immunol.*, 15, 456—460 (1985).
 100. Miller J., Malek T. R., Leonard W. J., Greene W. C., Shevach E. M., German R. N. Nucleotide sequence and expression of a mouse interleukin 2 receptor cDNA, *J. Immunol.*, 134, 4212—4217 (1986).
 101. Noma Y., Sideras P., Naito T., Bergstedt-Lindquist S., Azuma C., Severinson E., Tanabe T., Kinashi T., Matsuda F., Yaoita Y., Honjo T. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promotor, *Nature (London)*, 319, 640—646 (1986).
 102. Lee F., Yokota T., Otsuka T., Meyerson P., Villaret D., Coffman R., Mosmann T., Rennick D., Roehm N., Smith C., Zlotnik A., Arai K.-I. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell — and mast-cell-stimulating activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2061—2065, (1986).
 103. Yokota T., Otsuka T., Mosmann T., Banchereau J., DeFrance T., Blanchard D., De Vries J. E., Lee F., Arai K.-I. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5894—5898 (1986).
 104. Kinashi T., Harada N., Severinson E., Tanabe T., Sideras P., Konishi M., Azuma C., Tominaga A., Bergstedt-Lindqvist S., Takahashi M., Matsuda R., Yaoita Y., Takatsu K., Honjo T. Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II, *Nature (London)* 324, 70—73 (1986).
 105. Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsuda T., Kashiwamura S.-I., Nakajima K., Koyama K., Iwamatsu A., Tsunasawa S., Sakiyama F., Matsui H., Takahara Y., Taniguchi T., Kishimoto T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B-lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature (London)*, 324, 73—76 (1986).

Идиотипические сети

Константин А. Бона, Бенвенуто Пернис

(Constantin A. Bona, Benvenuto Pernis)

В 1974 г. Нильс Эрне [1] разработал теорию, согласно которой иммунная система представляет собой сеть взаимодействующих идиотипов. Возникновение этой теории вызвало громадный скачок в сознании специалистов, интересующихся проблемой регуляции иммунного ответа, и привело к появлению в области клеточной иммунологии отдельной дисциплины.

По теории Эрне в индивидуальных молекулах иммуноглобулинов (Ig) необходимо различать два основных набора участков, с помощью которых они взаимодействуют с другими компонентами иммунной системы. Каждая молекула обладает связывающим центром, с помощью которого она реагирует с обычными антигенами, а также, как подчеркивал Эрне, с молекулами Ig, несущими идиотипические детерминанты, иммунологически сходные с детерминантами антигенов. Эрне назвал области Ig, взаимодействующие с антигенами, *паратопами* (p); антигенные детерминанты обычных антигенов получили название *эпитопов* (e). Каждая молекула Ig экспрессирует одну или несколько антигенных детерминант, определяемых структурой ее переменных областей. Эти детерминанты уникальны; они присущи лишь ограниченному числу молекул Ig. Такие идиотипические детерминанты называются *идиотопами* (i).

Основной постулат теории сетей состоит в том, что существуют молекулы Ig, несущие идиотопы, иммунологически сходные с очень многими, если не со всеми природными эпитопами. Таким образом, у каждого организма имеется набор идиотопов, сходных с детерминантами всех антигенов, с которыми организм встречается при естественной или искусственной иммунизации. Такие идиотопы были названы *внутренними образами антигенов*.

Второй основной постулат теории заключается в том, что для каждого антигена, продуцирующего данный паратоп (p_1) и идиотоп (или совокупность идиотопов) (i_1), существует комплементарное антитело, несущее паратоп p_2 , способный связываться с i_1 ; такое антитело продуцирует также собственный набор идиотопов (i_2). Первое из двух антител обычно называют At_1 , второе — At_2 .

Поскольку у неиммунизированных животных уровень экспрессии любого индивидуального антитела и клона, ответственного за его образование, по видимому, неизменен, Эрне предположил, что взаимодействие антител, несущих p_2 , с поверхностными иммуноглобулиновыми рецепторами лимфоцитов, несущими i_1 , в основном, обеспечивает супрессию. Таким образом, At_2 подавляют образование At_1 . Напротив, действие антител, несущих i_1 , на лимфоциты, экспрессирующие иммуноглобулиновые рецепторы типа p_2 , должно быть направлено на стимуляцию этих клеток. Эта концепция привела к новому представлению, согласно которому обычные антигены стимулируют специфический иммунный ответ не путем прямой активации лимфоцитов, несущих рецепторы, специфичные для эпитопов данного антигена. Вместо этого антиген рассматри-

вается как вещество, нарушающее равновесие, в котором клоны, продуцирующие At_1 (p_1, i_1), стимулируются внутренними образами антигена (p_0, i_0) и подавляются молекулами At_2 (p_2, i_2). Нарушение происходит из-за связывания небольшого количества At_1 , обычно содержащегося в крови. Поскольку At_1 супрессируют клетки, несущие внутренние образы антигенов (p_0, i_0), и стимулируют клетки, содержащие p_2 и i_2 , удаление At_1 из кровотока должно вести к пролиферации клеток, обладающих внутренним образом, и подавлять рост клеток, продуцирующих At_2 . Это должно стимулировать клетки, несущие At_1 , и приводить к заметному увеличению количества циркулирующих молекул At_1 . Это в свою очередь будет стимулировать клетки, экспрессирующие At_2 , что в результате приведет к супрессии At_1 -несущих клеток. При этом устанавливается новое равновесие, но уже с другим числом клеток, несущих At_1 , чем у неиммунизированного животного. Таким образом, концепция сетей позволяет объяснить не только первичную реакцию на антиген, но и иммунологическую память, возникающую в результате иммунизации.

Исходная теория иммунной сети, предложенная Ерне, нуждается в некотором пересмотре и расширении для того, чтобы удовлетворять современным экспериментальным данным. Во-первых, Ерне рассматривал лишь В-лимфоциты и продуцируемые ими антитела. В настоящее время ясно, что в идиотипической регуляции принимают участие и Т-лимфоциты. На самом деле, Т-лимфоциты могут быть значительно более важным элементом идиотипической регуляции, чем В-клетки и антитела. Во-вторых, становится все более очевидным, что взаимодействие p_2 -несущих антител (или Т-клеток) с лимфоцитами, экспрессирующими рецепторы, несущие i_1 , не обязательно ведет к супрессии, а часто может оказывать стимулирующее действие. Точно так же, маловероятно, что клетки или молекулы, несущие i_1 , всегда стимулируют клетки с рецепторами, содержащими p_2 . Таким образом, взаимодействие типа $p \rightleftharpoons i$ могут быть либо угнетающими, либо стимулирующими в зависимости от конкретных условий. И наконец, в-третьих, представление о том, что антигены стимулируют иммунный ответ не прямо, по-видимому, неверно как для Т-клеток, так и, по предварительным данным, для В-клеток.

Хотя эти поправки могут привести к коренному пересмотру наших представлений об идиотипической регуляции, они не снижают потенциальной важности самой концепции иммунной сети для понимания механизмов регуляции иммунного ответа.

22.1. Данные, подтверждающие теорию иммунной сети

Представление о наличии идиотипической иммунной сети вызвало множество исследований по регуляции иммунного ответа. В работах последних лет были получены экспериментальные данные, проливающие свет на механизмы взаимодействия клонов, основанные на идиотипических связях.

22.1.1. Идиотипы как аутоантигены

Открытие идиотипии Кункелем и др. [2] и, независимо, Удином и Мишелем [3] стало возможным после того, как удалось получить антитела против идиотипических детерминант молекул антител. Главное предсказание концепции сетей состоит в том, что идиотипические детерминанты являются аутоиммунотгенами. Впервые синтез антител против собственных идиотипов продемонстри-

ровал Родки [4]. От одного кролика им были выделены и очищены антитела к три-метиламмониевому гаптену. Когда спустя год эти антитела были введены тому же кролику, у него образовались антиидиотипические антитела. Этот опыт отчетливо показал, что идиотипические детерминанты могут вызвать в аутологичной системе синтез антиидиотипических антител. Точно так же на сингенных мышах было продемонстрировано образование антиидиотипических антител против идиотипов миеломных белков [5]. Исследования синтеза антиидиотипических антител в сингенных системах показали, что такие антитела легче получить против идиотопов миеломных белков, не похожих на идиотопы естественных антител, возникающих в ответ на антигены микроокружения. Напротив, антиидиотипические антитела против идиотипов, имеющих и у собственных антител, содержащихся у неиммунных животных в значительных количествах (например, T15, J558, E109, X24 IdX), могут быть получены лишь после определенных ухищрений, например супрессии этих идиотипов у новорожденных животных [6]. Эти исследования показали, что ответ на идиотип в аутологичной системе часто требует введения идиотипа в количествах, превышающих некую пороговую величину, в смеси с адъювантом и (или) после конъюгации с иммуногенным носителем. Более того, образование антиидиотипических антител достигается легче, если во время иммунизации концентрация идиотипа в сыворотке иммунизируемого животного очень низка. В этом отношении индукция образования аутоантиидиотипических антител сходна с индукцией синтеза любых других аутоантител.

22.1.2. Каскад комплементарных антиидиотипических реакций

Формальное подтверждение существования иммунной сети было получено в опытах, показавших, что идиотипические детерминанты молекул Ig могут быть аутоиммуногенами. Иначе говоря, каждое At_1 может вызвать образование

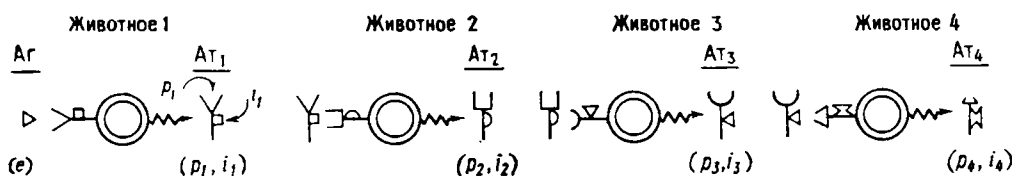


Рис. 22.1. Классическая схема взаимодействия идиотипа с паратопом.

Связывание идиотопов (или эпитопов) с паратопами рецептора приводит к активации клеток, несущих этот рецептор; в то же время связывание паратопов с идиотопами рецептора супрессирует клетки, несущие рецепторы. На приведенной схеме использованы следующие обозначения: At_1 — антитела, появляющиеся у животного 1 в результате иммунизации его эпитопом (е).

At_1 обладают паратопом (p_1), специфичным в отношении к эпитопу, и идиотопом (i_1). Антитела At_1 используются для иммунизации животного 2. В результате у него образуются антитела At_2 , которые должны содержать паратоп (p_2), специфичный для i_1 , и набор собственных идиотопов i_2 . В свою очередь в ответ на введение At_2 продуцируются антитела At_3 , а в ответ на At_3 — антитела At_4 . Согласно этой схеме, иммунная сеть «не замкнута» или «бесконечна».

At_2 . Идиотопы молекул At_2 в свою очередь должны вызвать образование идиотопов At_3 , а те в дальнейшем — синтез At_4 и т. д. Оказалось, что действительно, иммунизируя нормальных, подобранных по аллотипам кроликов или сингенных мышей, можно получить антитела At_3 и At_4 (рис. 22.1).

У мышей линии BALB/c, иммунизированных антителами At_1 , мы наблюдали спонтанное появление антител At_3 (т. е. анти-антиидиотипических антител)

[7]; это свидетельствует о том, что At_3 — нормальный компонент идиотипической цепи. Возможность получения неограниченного количества комплементарных антиидиотипических антител путем иммунизации нормальных животных предшествующим членом цепи идиотипов свидетельствует о существовании незамкнутой идиотипической сети [8].

Иммунохимические свойства четырех членов (At_1 — At_4) сети исследованы на двух системах: на кроликах, у которых инициатором синтеза At_1 служили антитела против полисахарида *Micrococcus lysodeikticus*, и на мышах, у которых образование At_1 инициировалось моноклональным белком А48, связывающим бактериальный леван (БЛ). Неожиданно оказалось, что At_4 обладают антигенсвязывающей активностью At_2 , поскольку и At_2 , и At_4 связываются с At_1 [7, 9]. Из этих результатов был сделан вывод о незамкнутости идиотипической сети.

Каскад идиотипических-антиидиотипических Т-клеток, аналогичный каскаду антиидиотипических антител, был обнаружен Нисоноффом и сотр. [10], исследовавшими иммунный ответ на эпитоп — азобензиларсонат (АБА) [10], а также в опытах по гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), проведенных группой Бенаццерафа [10]. Т-клетки, реагирующие на АБА и Т-клетки, участвующие в ГЗТ-ответе на нитрофенилацетатный гаптен (НФ), могут быть в равной степени примированы как антигеном, так и антиидиотипическими антителами. Это говорит о том, что их антигенсвязывающие рецепторы клеток разделяют идиотипические детерминанты с антителами. Экспрессия клеток, ответственных за ГЗТ, регулируется супрессорными Т-клетками. В цепи реакций супрессии антиген-специфические Т-клетки (T_{s1}) секретируют фактор T_sF_1 . Этот фактор обладает антигенсвязывающей активностью, имеет идиотипические детерминанты, сходные с таковыми антител, экспрессирует антигенные детерминанты I-J; его активность не зависит от комплекса H-2. Появление клеток T_{s1} индуцируется введением антигена, связанного с сингенными клетками, или небольшими количествами антиидиотипических антител. Фактор T_sF_1 индуцирует появление T_{s2} -супрессорных клеток (T_{s2}), секретирующих фактор T_sF_2 . Этот фактор не связывается с антигеном или антиидиотипом, но может инактивироваться идиотипом, т. е. обладает антиидиотипической специфичностью. Этот факт хорошо согласуется с данными по индукции развития супрессорных клеток введением идиотипа, ассоциированного с сингенными клетками. Активность фактора T_sF_2 рестриктирована по H-2; действует он либо прямо на В-клетки, либо, может быть, на примированные антигеном клетки T_{s3} , несущие идиотип и являющиеся эффекторными клетками в супрессии ГЗТ (см. [10]).

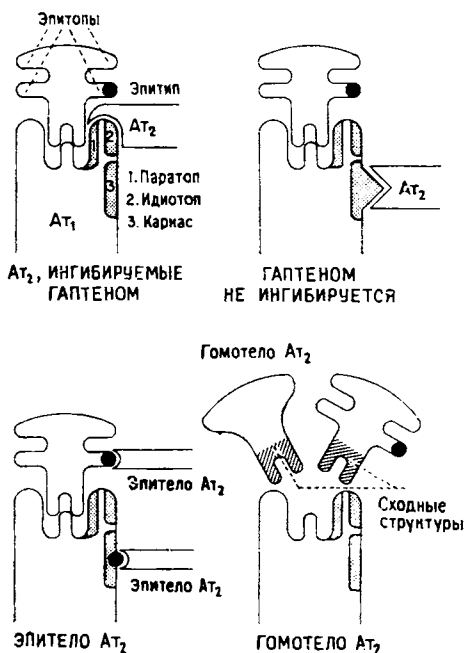
22.1.3. Идиотопы — внутренние образы антигена

В результате гетерологичной, гомологичной или сингенной иммунизации можно получить два основных вида антиидиотипических антител. Одни из них — антитела непосредственно против идиотопов, ассоциированных с антигенсвязывающими участками; связывание таких антител подавляется гаптенами. Другой тип антиидиотипических антител узнает лишь детерминанты в каркасных участках V-области; связывание таких антител не ингибируется гаптенами. Между тем при иммунизации животных антителами At_1 обнаружилось, что можно получить еще по крайней мере два типа антиидиотипических антител. *Гомотела* представляют собой антиидиотипические антитела, имитирующие антигенные детерминанты (т. е. несущие внутренние образы антигена), а иногда способные даже выполнять его функции [11]. *Эпитела* — антиидиоти-

пические антитела, взаимодействующие с перекрестно реагирующими структурами, имеющимися как в эпитопах, так и в идиотопах комплементарных молекул [12] (рис. 22.2). Гомотела выявлены в различных антигенных системах, например при иммунизации инсулином, белком, связывающим ретинол, пептидом F-Met-Leu-Phe, алпренелолом и Fcγ-фрагментом иммуноглобулинов (табл. 22.1). Анализ данных, помещенных в таблице, позволяет выявить ряд особенностей, свойственных гомотелам: а) обычно гомотела образуются при использовании белковых антигенов, б) один из членов идиотипической цепи, в которой были идентифицированы гомотела, получен в гетерологичной системе,

Рис. 22.2. Различные типы антител против идиотопов (At_2).

Гомотела, изображенные в правой нижней части рисунка, несут идиотопы, перекрестно-реагирующие с обычными антигенными детерминантами (эпитопами), и потому узнаются антителами, специфичными к эпитопам. Идиотопы гомотел иногда называют «внутренними образами антигена». Эпитела (внизу, слева) узнают антигенные детерминанты, находящиеся как на обычных антигенах, так и на антителах, специфичных к эпитопам этих антигенов. Поскольку и гомотела, и эпитела связываются с возникающими в результате иммунизации At_1 , они представляют собой подгруппу молекул At_2 . Однако в реакции между At_1 и гомотелом фактически участвуют паратоп At_1 и идиотоп гомотела; поэтому гомотела можно обозначить как At_0 . Паратопы антиидиотипических антител (At_2) могут реагировать с идиотопами, расположенными вблизи (или внутри) паратопа At_1 (наверху слева). В этом случае связывание эпитопа (здесь гаптена) с паратопом At_1 будет предотвращать связывание At_2 . Другие At_2 узнают идиотопы, не связанные тесно с паратопом At_1 (наверху справа). В этом случае связывание гаптена с паратопом At_1 не будет подавлять связывание At_2 с таким идиотопом.



в) некоторые гомотела имитируют функции антигенов. Это, в частности, относится к анти(антиинсулиновым)-гомотелам, способным связываться с инсулиновыми рецепторами и оказывать таким образом инсулиноподобный эффект [13]. Другой пример — анти(антиалпренелоловые)-гомотела, связывающиеся с β-адренергическими рецепторами, что ведет к повышению активности аденлат-циклазы [14].

Эпитела были обнаружены недавно при иммунизации мышей линии A/J моноклональным IgM человека с анти-γ-глобулиновой активностью. Небольшая ($\approx 10\%$) фракция этих антител связывается как с детерминантами каркаса V_{Hc} -фрагмента, так и с фрагментами Fcγ антител человека [14].

Существование гомотел и эпител подтверждает идею о внутреннем образе антигена. Согласно этой концепции, идиотопы — это положительные отпечатки антигена, и, следовательно, идиотопы ряда молекул At_2 похожи на эпитопы.

Гомотела и эпитела составляют лишь малую часть антиидиотипических антител. Это может объясняться либо слабой иммуногенностью структур, общих для эпитопа и идиотопа, либо низкой частотой возникновения клонов, способных узнавать такие структуры. Низкой иммуногенностью структур,

общих для идиотопа и эпитопа, можно объяснить, почему большая часть гомотел была получена в гетерологичной системе и при использовании белка в качестве антигена. Гетерологичная иммунизация часто повышает иммуногенность перекрестно-реагирующих структур, а белковые антигены в отличие от полисахаридных обычно индуцируют появление антител с более высоким родством к антигену.

Таблица 22.1. Примеры гомотел

Антиген — инициатор идиотипической цепи	Виды животных, продуцирующих антитела Ат ₁	Виды животных, продуцирующих антитела Ат ₂	Свойства антител Ат ₂	Источники данных
Инсулин	Крыса	Кролик	Стимулируют поглощение α -амино-изомасляной кислоты тимоцитами	[13]
Рецепторы, связывающие ретинол	»	»	Связываются с рецепторами витамина А в клетках кишечника	[13]
Алпренелол	Кролик	»	Связываются с β -рецепторами и повышают активность аденилат-циклазы	[14]
Пептид F-Met-Leu-Phe	Крыса	»	Угнетают связывание пептида F-Met-Leu-Phe с рецепторами нейтрофилов	[15]
Гемагглютинин реовирусов	Мышь	»	Взаимодействуют с клетками, способными связывать гемагглютинины реовирусов	[16]
Человеческий иммуноглобулин (IgM), обладающий активностью против фрагмента Fc γ	»	Мышь	Связывается с фрагментом Fc γ человеческого иммуноглобулина	[12]
Аллоциты кролика	Кролик	Кролик	Вызывают синтез антител против аллотипов	[17]

Данных о структурах, характеризующих гомотела и эпитела, пока нет. Весьма вероятно, что внутренние образы — это лишь кажущиеся (топохимические) копии антигенов, продукт стерического сходства, а не идентичности последовательности аминокислот. Тем не менее значение способности распознавать «свое» (идиотипы) и появление детерминант, сходных с чужеродными детерминантами (эпитопами) в антиидиотипических антителах, имеет очень важное значение для понимания механизма защиты хозяина и возникновения аутоиммунных заболеваний.

22.1.4. Параллельные наборы

Поскольку идиотипы служат фенотипическими маркерами генов области V, вначале считалось, что, как правило, каждый ген области V кодирует уникальные паратоп и идиотоп. Однако вскоре Удин и Казенаве [18] показали, что идиотипические детерминанты кроличьих антител против овальбумина кур сходны с идиотипическими детерминантами антител, специфичных для овальбумина индеек или уток, или даже с идиотипическими детерминантами, не обладающими способностью реагировать с овальбумином. Антитела с неизвестной антигенной специфичностью, но имеющие идиотопы, сходные с таковыми у антител

с известной антигенсвязывающей активностью, были названы *параллельными наборами* или *неспецифическими иммуноглобулинами*. Описаны четыре типа параллельных наборов.

22.1.4.1. Спонтанно возникающие параллельные наборы

Такие молекулы иммуноглобулинов можно обнаружить у неиммунизированных животных; их содержание не зависит от антигенной стимуляции. Подобные параллельные наборы были выделены в 1979 г. [19] из сыворотки молодых мышей линии BALB/c. В ней содержались молекулы иммуноглобулина, несущие идиотип (IdXA) антител против фруктозана β ($2 \rightarrow 1$), но не обладающие фруктозансвязывающей активностью. Концентрация таких антител не менялась после иммунизации бактериальным леваном, имеющим детерминанты β ($2 \rightarrow 1$). Недавно Лиу и др. [20] выделили из мышей BALB/c иммуноглобулины, не адсорбирующиеся на иммуносорбенте с вирусом гриппа В Lee, но обладающие идиотипом моноклональных антител, специфичных для гемагглютинина этого вируса. Точно так же Держак и Джейнуэй [21] обнаружили необычайно высокие концентрации (≈ 250 мкг/мл) Ig, не связывающихся с тринитрофениллизинном (ТНФ), но имеющих идиотипические детерминанты (460Id) миеломного белка МОРС460, связывающего ТНФ. Следует отметить, что эти несущие 460Id иммуноглобулины без ТНФ-связывающей активности были идентифицированы у мышей различных линий с помощью специфических кроличьих анти-460Id-антител, ингибируемых гаптенем [22]. Эти молекулы Ig не удавалось выявить ни с помощью других кроличьих антител против идиотипа 460, ни с помощью гомологичных (A/J) или сингенных (BALB/c), ингибируемых гаптенем моноклональных антител против идиотипа 460 [23].

22.1.4.2. Параллельные наборы, индуцируемые антигеном

Как было показано группой Казенаве [24], у кроликов, иммунизированных пероксидазой, цитохимическими методами можно идентифицировать клетки двух типов. Одни клетки связывают антиген (пероксидазу) и антиидиотипические антитела. Другие клетки способны окрашиваться лишь антиидиотипическими антителами. Следовательно, даже при стимуляции антигеном в определенных условиях может индуцироваться синтез параллельных наборов. Работы группы Аврамеаса [25] указывают на определенное родство молекул, связывающих антиген, и параллельных наборов, несущих сходные идиотипы.

22.1.4.3. Параллельные наборы, индуцированные липополисахаридом

Возникновение параллельных наборов у антител с неизвестной специфичностью, несущих идиотипы, наблюдается не только при антигенной стимуляции, но также и при инкубации В-клеток *in vitro* с поликлональными активаторами. Клетки селезенки мышей линии A/J, иммунизированные стрептококком А, подвергали стимуляции липополисахаридом (ЛПС). В результате наблюдалась пролиферация предшественников клеток, продуцирующих антитела против А-СНО, несущие идиотип А5А. Кроме того, размножались предшественники клеток, продуцирующих молекулы, несущие идиотип А5А, но лишенные А-СНО-связывающей активности [26].

22.1.4.4. Параллельные наборы, индуцированные антиидиотипическими антителами

Ряд данных свидетельствует о том, что в результате иммунизации сингенными, гомологичными или гетерологичными антиидиотипическими антителами появляются антитела, представляющие собой типичные параллельные наборы. Такие антитела несут идиотипы At_1 , но лишены антигенсвязывающей активности At_1 . Например, антитела, полученные в результате иммунизации мышей сингенными антителами к идиотипам 460 или A48, несут эти идиотипы, но лишены способности связывать ТНФ или БЛ соответственно [7, 23]. Идиотип A48 экспрессируется на бактериальном белке АВРС48, связывающем леван, а идиотип 460 — на белке МОРС460, связывающем ТНФ. Антитела, полученные у сходных по аллотипу кроликов, в ответ на иммунизацию гомологичными антителами против антител к полисахариду *Micrococcus lysodeikticus* несут идиотипы антиполисахаридных антител, но не способны связывать сам полисахарид [9]. Наконец, у мышей, иммунизированных крысиными антителами против перекрестно реагирующего идиотипа антиарсонатных антител, получены иммуноглобулины, несущие этот идиотип, но не связывающие арсонат [27]. Точно так же Ig, полученные в результате иммунизации мышей свинными анти-Н-2^k-антителами, имеют идиотипы моноклональных антител против Н-2^k, но не обладают анти-Н-2^k-специфичностью [28].

Возникает вопрос: сходство идиотипов — это случайное явление, наблюдающееся среди антител, обладающих специфичностью к разным антигенам, или, напротив, оно возникает лишь среди антител, обладающих специфичностью к родственным антигенам? Эрне считал более вероятным случайное возникновение общих идиотипов на том основании, что набор идиотипов иммуноглобулинов больше набора паратопов [1]. Говоря генетическим языком, раз-

Таблица 22.2. Сходные идиотипы среди антител с различной специфичностью

Специфичность антигена	Иммунизируемые животные	Идиотипы антител	Антигенная специфичность антител, несущих сходные идиотипы	Источники данных
Овальбумин кур	Кролик	Идиотип овальбумина	Овальбумин уток и кур	[18]
Гемагглютинин вируса гриппа PR8	Мышь	Перекрестно-реагирующий идиотип X гемагглютинина PR8	Различные эпитопы гемагглютинина PR8	[20]
Гемоглобин клеток больных серповидноклеточной анемией	Коза	Идиотип валина	Гемоглобин взрослых	[32]
Аллотип IgG _{2a} ^b	Мышь	IgX антител к аллотипу IgG _{2a} ^b	Домены CH ₂ и CH ₃ IgG _{2a} ^b	[33]
Лизоцим яичного белка	»	IgX лизоцима куриных яиц	LII- и N-C-фрагменты лизоцима куриных яиц	[34]
GTGL	»	Идиотип GTGL	GT и GL	[35]
Миоглобин	»	IgX	Отдельные эпитопы миоглобина	[36]
ЛПС <i>E. coli</i> 113	»	IgX-Z	ЛПС <i>S. transgoa</i> (МОРС 384 и МОРС 870)	[37]

личные комбинации идиотопов с паратопами могут появляться вследствие вставки мини-генов [29], соматической мутации в генах области V [30] или при рекомбинации генов V, D и J, т. е. при тех событиях в различных клонах соматических клеток, которые изменяют экспрессию генов переменных областей.

Между тем анализ экспериментальных данных, полученных при исследовании сходных идиотопов, показывает, что они чаще наблюдаются среди антител против родственных антигенов (табл. 22.2). Недавно мы показали, что сходные идиотопы можно обнаружить среди моноклональных антител, специфичных для иммунодоминантных сахаров (глюкозы и галактозы) ЛПС *Escherichia coli* 113 и моноклональных белков МОРС384 и МОРС870, специфичных для α -метил- β -D-галактозидного иммунодоминантного сахара ЛПС *Salmonella tranaroa*, *S. telaviv* и *Proteus mirabilis* [37]. Учитывая эти результаты, мы предложили новую теорию возникновения сходных идиотипов, предполагающую их возникновение из общего гена V. В случае антител, специфичных для различных иммунодоминантных сахаров полисахаридов грам-отрицательных бактерий, один из нас [37] предположил, что в раннем филогенезе предшественник гена V, по-видимому, обуславливал специфичность антител к предшественнику полисахаридного антигена. В процессе эволюции у этого полисахарида возникали новые антигенные детерминанты; параллельно с этим вариации в генах V приводили к возникновению антител с новой специфичностью. Такие антитела подвергались независимому эволюционному отбору, который не затрагивал участков ДНК, кодирующих общие идиотипы. Концепция родоначального гена V как источника общих идиотипов предсказывает, что это явление характерно лишь для антител, направленных против родственных антигенов [табл. 22.2].

22.1.5. Регуляция гуморального и клеточного иммунного ответа, определяемая идиотипами

Взаимодействие между клонами, основанное на идиотипических связях, можно рассматривать только в том случае, если идиотипы представляют собой клональные маркеры. Мембранные иммуноглобулиновые рецепторы, подобно гуморальным антителам, несут антигенные детерминанты молекул иммуноглобулинов, такие, как изотип, аллотип и идиотип. Идиотипы были найдены в рецепторах Ig нормальных и опухолевых В-клеток [38]; Клаффин и др. [39] убедительно показали, что идиотип T15 Id X представляет собой мембранный маркер клона клеток, продуцирующих антитела против фосфорилхолина.

Существуют также данные, свидетельствующие о том, что идиотипы экспрессируются на антигенсвязывающих рецепторах Т-клеток, поскольку

а) Т-клетки окрашиваются антиидиотипическими антителами, б) некоторые функции Т-клеток можно подавить такими антителами, в) антиидиотипические антитела могут активировать Т-хелперы, Т-супрессоры и Т-эффекторы вместо антигена, г) в некоторых системах идиотипы и другие детерминанты домена V_H были обнаружены в рецепторах, выделенных из Т-клеток, или в материале, продуцирующемся Т-клетками [38].

Выявление идиотипических детерминант в антигенсвязывающих рецепторах Т- и В-клонов говорит о том, что они могут служить участками, с помощью которых осуществляется функционирование лимфоцитов. Иммунная система при этом представляется подлинной сетью V-участков, так как и Т-, и В-лимфоциты обладают идиотипическими детерминантами, ассоциированными с их рецепторами.

е идиотипов на мембранных рецепторах Т- и В-лимфоцитов служит основой, которая обеспечивает регуляторную роль идиотипической системы. Далее мы рассмотрим вопросы, связанные с тем, как эта регуляция.

5.1. Ингибиторный эффект антиидиотипических антител в основных допущениях теории иммунной сети связано со способностью идиотипических антител вызывать супрессию клонов, несущих те же идиотипы. Явление идиотипической супрессии послужило основой для

та 22.3. Экспериментально индуцированная идиотипическая супрессия

Вид животных	Антитела против идиотипов, использованных для индукции супрессии	Способ введения антител против идиотипов	Супрессия		Продолжительность супрессии
			антительного компонента	идиотипического компонента	
Мышь	Гомологичные	Обработка in utero	Сильная	Полная (идиотип J558)	Стойкая
»	» »	» »	»	Полная (идиотип T15X)	»
»	» »	» »	»	Полная (идиотип E109X)	»
»	Сингенные	» »	»	Полная (идиотип 460)	»
»	Гомологичные	Введение при рождении	Частичная	Полная (идиотип T15X)	»
»	То же	То же	»	Полная (идиотип E109X)	»
»	Гетерологичные (кролик)	Введение взрослым животным	—	Полная (идиотип Agr X)	»
»	Гетерологичные (морская свинка)	» »	—	Полная (идиотип A5A)	В зависимости от дозы
»	Гомологичные	» »	Сильная	Полная (идиотип T15X)	2—3 месяца
»	» »	» »	»	Полная (идиотип E109X)	То же
Кролик	» »	» »	Частичная	Полная	Стойкая

шей моделью для изучения регуляторной роли антиидиотипических антител. Супрессия, описанная для ряда антигенных систем (табл. 22.3), может индуцироваться парентеральным введением антиидиотипических антител новорожденным или взрослым животным или контактом с антителами в период внутриутробного развития.

Идиотипическая супрессия характеризуется рядом особенностей: а) она может быть вызвана гетерологичными, гомологичными или сингенными антиидиотипическими антителами; б) антитела, вызывающие супрессию, могут принадлежать к различным классам Ig [50]. Исключением является система идиотипов А5А, в которой супрессию удается индуцировать лишь антителами против идиотипов А5А морской свинки, принадлежащими классу IgG₂; в) супрессию нельзя вызвать фрагментами F(ab')₂. Следовательно, важную роль в индукции супрессии играет перекрестное связывание фрагмента Fc с поверхностными рецепторами лимфоцитов, несущими идиотипы [50]; г) супрессия, вызванная антиидиотипическими антителами, является длительной, но она не обусловлена делецией клонов. Действительно, частота предшественников у супрессированных и нормальных животных почти одинакова [26], и обычно животные выходят из состояния супрессии через несколько месяцев [38]. Идиотипическая супрессия не меняет величины антительного ответа в том случае, если идиотип мишени представляет собой относительно минорный компонент иммунного ответа (например, в системах АБА или А-СНО-стрептококк А). Напротив, если идиотип доминантен, как это бывает в системе Т15, то в результате идиотипической супрессии появляются клоны Т15⁻, отсутствующие при нормальном иммунном ответе на фосфорилхолин [6]; д) за идиотипическую супрессию ответственны два общих механизма, один из них связан с прямым действием антиидиотипических антител на предшественников В-лимфоцитов, несущих идиотип, что блокирует дифференцировку и созревание этих клеток после антигенной стимуляции. Такая супрессия является Т-независимой и не переносится В-клетками [48]. Второй механизм связан с образованием супрессорных Т-клеток, стимулированных антиидиотипическими антителами. Такая Т-зависимая супрессия может быть перенесена нормальным реципиентам с помощью Т-лимфоцитов [51].

22.1.5.2. Сходство антиидиотипических антител с антигеном

Для запуска цепи событий, приводящих к пролиферации клонов, дифференцировке покоящихся малых лимфоцитов и их созреванию в эффекторные клетки, требуется узнавание и связывание антигена рецепторами Т- и В-клеток. Поскольку идиотипические детерминанты экспрессируются на антигенсвязывающих рецепторах Т- и В-клеточных клонов, можно предсказать, что связывание антиидиотипических антител с рецепторами может имитировать связывание антигена. В работе группы Эйхманна [52] показано, что В-лимфоциты, взятые от мышей, которым вводились антитела против идиотипа А5А, способны кооперироваться с Т-лимфоцитами и продуцировать антитела против антигена А-СНО стрептококка А. Эти результаты, подтвержденные и в других работах, ясно показали, что антитела против идиотипов способны стимулировать дифференцировку предшественников В-лимфоцитов в антителообразующие клетки.

Аналогичные процессы обнаружены и у Т-хелперных клеток, специфичных в отношении антигена. Т-хелперы мышей, которым вводили полученные у морских свинок антитела против А5А, относящиеся к классу IgG₁, могли кооперироваться с индуцированными ТНФ В-лимфоцитами после иммунизации стрептококком А, конъюгированным с ТНФ. При этом начинали образовываться антитела против ТНФ [53]. Изящными опытами Эйхманна было доказано, что анти-

идиотипические антитела могут быть использованы вместо антигена и даже антигенного мостика. Если инкубировать *in vitro* в отсутствие антигена Т-хелперные клетки и В-лимфоциты мышей, иммунизированных стрептококком А, то небольшие количества антител против идиотипа А5А способны индуцировать синтез содержащих этот идиотип антител и образование бляшкообразующих клеток против антигена А-СНО, экспрессирующих идиотип А5А. На основании этих результатов авторы заключили, что Т- и В-лимфоциты мышей, иммунизированных стрептококком А, могут кооперироваться и без антигена в присутствии небольшого количества антител против идиотипа А5А, служащих в данном случае антигенным мостиком.

Индукция антиген-специфических Т-хелперов при введении антиидиотипических антител была обнаружена и на других системах, например, при иммунном ответе на триметиламмоний [54] или на фосфорилхолин [6].

Антиидиотипическими антителами можно стимулировать и клетки T_s , несущие те же идиотипы, что и антитела подобной специфичности. Антиген-специфические клетки T_s , несущие идиотип, образуются при парентеральном введении антиидиотипических антител в системах с использованием в качестве антигенов А-СНО стрептококка А и ФХ [53, 55]. Эти T_s -клетки несут также аллоантигены I-J и Lyt2. При иммунном ответе на АБА, НФ и фосфохолин найдены идиотип-положительные антиген-специфические супрессорные клетки, действующие на клетки, участвующие в реакции ГЗТ [56, 58]. Антиидиотипические антитела могут также заменять антиген при стимуляции пролиферации клеток, участвующих в реакции ГЗТ [59], реакции смешанных лимфоцитов (PC1) и в случае цитолитических Т-клеток [60].

В недавних опытах Виктора и др. [61] лимфоциты мышей (A/J $\times$ BALB/c) инкубировали *in vitro* с материнскими антителами против идиотипа J558 X. При этом значительная часть клеток экспрессировала индивидуальный идиотип миеломного белка J558 (J558 I, кодируемый геном D), но не перекрестно реагирующий идиотип J558 X, кодирующийся вторым гипервариабельным участком гена *Igh-V*. Часть клеток, окрашиваемых моноклональными антителами EB3-7-2 против идиотипа J558 I, окрашивается также антителами к Thy-1.2. Фракция, обогащенная такими клетками в результате адсорбции на чашках, покрытых антителами EB3-7-2, при введении животным обладала способностью подавлять синтез антител против α (1 $\rightarrow$ 3) декстрана, экспрессирующих идиотип J558. (Миеломный белок J558 обладает декстрансвязывающей активностью.) Способность таких клеток подавлять образование J558 Id⁺-антител против α (1 $\rightarrow$ 3) декстрана снималась обработкой клеток антителами против Lyt-2.2 плюс комплемент. Приведенные результаты показывают, что введение антиидиотипических антител *in utero* приводит к пролиферации идиотип-положительных супрессорных Т-клеток, ответственных, по-видимому, за длительную идиотипическую материнскую супрессию. В данном случае Т-клетки экспрессируют лишь идиотопы, кодируемые D-участком области V.

Таким образом, на Т- и В-лимфоцитах присутствуют одни и те же идиотипические детерминанты; взаимодействие таких детерминант с антиидиотипическими антителами приводит в ряде случаев к тем же результатам, что и связывание с соответствующими антигенами.

22.1.5.3. Антиидиотипические регуляторные Т-клетки

Антиидиотипические регуляторные Т-клетки специфичны к идиотипическим детерминантам иммуноглобулиновых рецепторов; поэтому они обладают тонким регуляторным действием на идиотип-положительные компоненты при любом

иммунном ответе. Преобладание T15⁺-антител при ответе на фосфорилхолин в значительной степени определяется наличием идиотип-специфических Т-хелперов. Частота появления таких клеток возрастает после введения животным белка T15 [62], а также в результате иммунизации фосфорилхолином [63].

В случае иммунизации антигеном А-СНО (стрептококка А) Т-хелперные клетки оказывают прямое действие на В-лимфоциты. В присутствии Т-клеток от мышей, иммунизированных белком А5А, В-клетки, предварительно обработанные стрептококком А, приобретали *in vitro* способность синтезировать в отсутствие антигена антитела, несущие идиотип против А-СНО. Описаны также идиотип-специфические супрессорные Т-клетки. На системе идиотипа 460 мы выявили естественные 460Id-специфические Т-супрессоры. Они адсорбируются на чашках, покрытых идиотипом 460, содержат антигены Lyt2 и Qa1 и обнаруживаются лишь у мышей с гаплотипом *Igh-C^a* и супрессируют В-лимфоциты, несущие идиотип 460 [64].

Образование идиотип-специфических Т-супрессоров может быть получено при введении антител против Id X. На системе Arg было показано, что такие супрессоры обладают теми же свойствами, что и природные Т-клетки, специфичные к идиотипу 460 [65].

Хелперные и супрессорные клетки, специфичные к идиотипу, играют важную роль в экспрессии клонов, несущих соответствующий идиотип, и обеспечивают функционирование иммунной сети. Исследование таких клеток позволяет понять взаимодействия между клонами клеток в иммунной системе.

22.2. Нарушения иммунной сети

Равновесие между клонами, основанное на идиотипических связях, чрезвычайно чувствительно к действию антигенов, идиотипов и антиидиотипов. Нарушение такого равновесия играет важную роль в физиологии иммунной системы и возникновении аутоиммунных заболеваний.

22.2.1. Нарушения, вызываемые антигенами

Для нормального животного характерно равновесие между клонами, продуцирующими At₁ и At₂. Согласно теории сети, введение антигена нарушает это равновесие, так как он связывается с At₁ и, удаляя их, лишает клоны At₂ стимулирующего действия i₁. В свою очередь это позволяет клонам At₁ уйти из-под контроля клонов At₂; в результате клоны At₁ при контакте с антигеном пролиферируют и дифференцируются. Когда в ходе иммунного ответа концентрация i₁ превысит пороговую величину, идиотоп стимулирует клоны At₂, подавляющие в свою очередь продукцию клонов At₁. Такая схема предполагает, что аутоантиидиотипические антитела должны появляться при обычном иммунном ответе и что колебательная природа ряда реакций на антиген может быть связана с регуляцией антиидиотипическими антителами по типу обратной связи. В некоторых антигенных системах в процессе обычного иммунного ответа появляются аутоантиидиотипические антитела к сыворотке, или антиидиотипические бляшкообразующие клетки (БОК), или клетки, связывающие идиотип в лимфоидных органах (см. обзор [38]). В этих системах между идиотипическими и антиидиотипическими антителами наблюдались обратные соотношения. Это объясняется не просто выведением At₁. Действительно, при иммунном ответе на фосфорилхолин и бактериальный леван (БЛ) было показано, что макси-

мальное количество БОК, экспрессирующих анти-T15 или анти-E109, выявляется тогда, когда число БОК, экспрессирующих эти идиотипы, резко падает.

Следует, однако, отметить следующее: появление аутоантиидиотипических антител не полностью подавляет клоны Id^+ , что свидетельствует об осуществлении не простого подавляющего действия, а более тонкой регуляции этими антителами. Даже при самых сильных иммунных ответах, когда идиотип доминантен, подавляются лишь отдельные клоны. Таким образом, гибкость иммунной системы позволяет хозяину использовать разные способы регуляции ответа организма на чужеродные антигены.

22.2.2. Нарушения, индуцированные идиотипами

На первый взгляд нарушения устойчивого состояния иммунной сети под действием идиотипов труднообъяснимы, так как идиотоп i_1 служит стимулирующим агентом для клонов At_2 . Введение большего количества i_1 могло бы привести к двум последствиям: либо вообще не оказать никакого действия на клоны At_2 , так как они уже стимулированы, либо увеличить и без того существовавшую супрессию клонов. Было, однако, показано, что введение идиотипа может в определенных условиях усилить содержание Id^+ -компонента при последующем иммунном ответе на антиген. Так, Рет и др. [66] установили, что введение моноклональных антител, связывающих НФ, перед иммунизацией животного конъюгатом НФ приводит к значительному увеличению фракции антител против НФ, несущих идиотопы тех моноклональных антител, которые были использованы для иммунизации.

Рубинштейн и др. [67] обнаружили, что введение новорожденному животному незначительных количеств идиотипа может активировать молчащий клон и превратить его в доминантный. В этом опыте изучали активацию «молчащих» клонов, реагирующих на БЛ и несущих идиотоп А48. Как правило, у мышей линии BALB/c или конгенных ($Igh-C^a$) или рекомбинантных линий мышей в ответ на иммунизацию БЛ эти клоны не активируются. Введение новорожденным мышам 10 мкг моноклонального белка А48 с последующей иммунизацией БЛ приводило к развитию доминантности идиотипа А48 в анти-БЛ-ответе.

Исследования подобной активации выявили ряд закономерностей: а) активация рестриктирована по идиотипу и может быть индуцирована лишь моноклональными антителами, несущими идиотип А48; б) активация является специфической в отношении антигена, так как не может быть вызвана ни посторонними антигенами, ни поликлональными активаторами, введенными *in vivo*; в) генетические исследования, проведенные на мышах различных линий, показали, что активация молчащих клонов, несущих идиотип А48, не зависит от семейств генов главного комплекса гистосовместимости и $Igh-C$; экспрессия клонов с идиотипом А48 обнаруживалась у мышей следующих линий: BALB.K($H-2^kIgh^a$) и BALB.B($H-2^bIgh^a$), BAB.14($H-2^dIgV_H^aIgC_H^b$), CB.R4($H-2^dIgV_H^bIgC_H^a$) и CAL.20($H-2^dIgh^a$) [68]; г) идиотип А48 не оказывает прямого действия на предшественники В-клеток, несущие этот идиотип, поскольку «активированное» состояние не может быть перенесено В-клетками неиммунизированным животным.

Механизм активации связан с экспрессией Т-хелперных клеток, специфичных к идиотипу А48. После стимуляции антигеном Т-хелперы обеспечивают преимущественное размножение предшественников В-лимфоцитов, несущих идиотип А48 при ответе на леван. Эти данные согласуются с результатами недавних исследований, в которых у неонатально супрессированных мышей, имму-

низированных белком T15, с высокой частотой обнаруживались Т-хелперы, специфичные к идиотипу T15 [62]. Отсюда следует, что идиотип-специфические клетки не только тонко регулируют иммунный ответ, но в определенных условиях способны отбирать тех из предшественников В-клеток, которые несут соответствующий идиотип, приводя к их доминированию в ответе.

22.2.3. Нарушения, определяемые антиидиотипами

Хорошо известно, что разнообразие семейства переменных областей появляется в процессе развития лимфоидных клеток в эмбриогенезе; предполагается, что при рождении репертуар переменных участков включает в себя и идиотипические, и антигенсвязывающие участки. В пользу этого предположения свидетельствуют новые данные о том, что введение при рождении анти-

Таблица 22.4. Эффект введения незначительного количества антиидиотипических антител новорожденным животным

Обработка при рождении	Иммунизация 1 мес спустя	Образование бляшкообразующих клеток (БОК)		Данные радиоиммунного анализа	
Система идиотипа 460 — Антитела к идиотипу 460 (0,01 мкг) Антитела к идиотипу 460 (10 мкг)	(ТНФ + фи-колл) 20 мкг То же » »	Количество клеток, специфичных к ТНФ/селезенка		Н. О. » » » »	
		Общее	БОК с идиотипом 460		
		4,733±0,036	18±2,2		
		4,584±0,274	34,6±4,6 (p < 0,01)		
		4,535±0,076	31,1±5,2 (p < 0,05)		
Система идиотипа А48 — Антитела к идиотипу А48 (0,01 мкг) Антитела к идиотипу А48 (10 мкг)	БЛ 20 мкг То же » »	Количество БОК, специфичных к БЛ/Селезенка		Идиотип А48 (мкг/мл) 0,04±0,002 0,430±0,162 Н. О.	
		общее	БОК с идиотипом А48		
		3,290±0,110 3,431±0,021	6±3 52±2		
		2,396±0,186	73±19		
		Количество БОК, специфичных к α (1 → 3) декстрану/10 ⁶ клеток			
Система идиотипа J558 — Антитела ЕВ3-2-7 к идиотипу J558I (0,01 мкг)	В1355S 100 мкг В1355S 100 мкг	1,155±211		Идиотипы X и I (мкг/мл) Идио-тип X Идио-тип I	40 6 200 60
		2,886±311			

идиотипических антител может привести к нарушению устойчивого состояния и надолго изменить набор клонов, возникающих при ответе на данный антиген. Определяемая идиотипом В-клональная экспансия может быть индуцирована введением небольших количеств антиидиотипических антител новорожденным животным.

Мы исследовали влияние неонатального введения анти-Id-антител в трех различных системах [61, 69] а) при ответе на БЛ, когда «молчащие» клоны, несущие идиотип А48, активировали введением сингенных поликлональных антител против идиотипа А48; б) при ответе на ТНФ, при котором клоны, обладающие идиотипом 460 (при нормальном иммунном ответе их мало), активировали введением сингенных моноклональных антител против идиотипа 460; в) при ответе на α (1 $\rightarrow$ 3) декстран, когда клоны, экспрессирующие идиотип J588 I, активировали моноклональными антителами ЕВЗ-7-2 против идиотипа J588 I.

На этих трех системах было показано, что введение 10 нг антител против идиотипа однодневным мышам за 1 мес до антигенной стимуляции приводит к активации молчащих клонов с идиотипом А48 и к значительному повышению количества минорных клонов, несущих идиотип 460Х и J588I соответственно (табл. 22.4).

Как четко показано на примере системы А48, активация, вызываемая антиидиотипическими антителами, идиотип-специфична и требует антигенной стимуляции. Эти данные противоречат результатам работы Форни и др. [70], в которой описывается независимая от антигена активация клонов антителами, введенными взрослым мышам. В работах группы Раевского [66] эффект, не требующий антигенной стимуляции, не был обнаружен. В опытах, проведенных этими исследователями, увеличение концентрации Id⁺-компонента при анти-НФ-ответе, вызванном введением моноклональных антиидиотипических антител, также было идиотип-специфическим и требовало антигенной стимуляции. На системе идиотипа А48 было показано [71], что активация клонов А48 Id⁺ путем введения новорожденным животным ничтожно малого количества антител против идиотипа А48 не зависит от Т-клеток, но связана с прямым взаимодействием антиидиотипических антител с иммуноглобулиновыми рецепторами клонов, несущих идиотип А48 [71].

22.3. Регуляторная идиотипическая сеть

Результаты исследований последних лет, углубившие наши представления о механизмах регуляции иммунного ответа, противоречат некоторым аспектам концепции сети, предложенной в 1974 г., и ее более поздним модификациям. Эта концепция предполагает, что размножением клонов управляет взаимодействие паратопов с идиотопами, так как именно идиотопы представляют собой стимул для иммунокомпетентных клеток. Руководствуясь этим утверждением, Кутино и др. [72] предположили, что идиотопы, как и анти-идиотопы, являются поликлональными активаторами, которые способны сами по себе обеспечить *in vivo* весь репертуар. Однако данные по отбору и размножению *in vitro* линий или клонов Т- и В-клеток недвусмысленно показали, что эти явления обычно зависят от антигена [73]. Кроме того, опыты, проведенные *in vivo* при физиологических условиях, свидетельствуют о том, что для экспрессии клонов у животных, примированных идиотипами или антиидиотипами, требуется антигенная стимуляция. Более того, хорошо известно, что у стерильных животных содержание Ig в сыворотке крайне незначительно. Это противоречит предположению

о том, что так называемые нормальные иммуноглобулины образуются при ауто-стимуляции иммунной системы.

Другая трудность теории сети — ее направленный характер. Для каждого антитела At_1 в принципе может продуцироваться бесконечное количество антиидиотипов (At_2 — At_n). Если это так, то иммунная система призвана идентифицировать не антигены, а идиотопы. Это утверждение противоречит представлению о том, что антигены являются основным селективным фактором, ответственным за эволюцию иммунной системы у позвоночных.

На основании данных, полученных в результате функционального и иммунохимического анализа двух идиотипических цепей у кролика [9] и мыши [7] можно утверждать, что антитела против антиидиотипов (At_3) сходны с At_1 , а антитела против At_3 (At_4) сходны с At_2 . Следовательно, иммунная система развивается не в одном направлении и в функциональном смысле она небесконечна.

В одной из этих систем в качестве At_1 использовали АВРС48, (A48) — моноклональный белок, связывающий БЛ у мышей BALB/c. Такие антитела обладают паратопом p_1 , специфичным для эпитопов β -(2 $\rightarrow$ 6)-фруктозана и i_1 , идиотопами белка A48. Иммунизация мышей линии BALB/c белком A48 приводит к образованию антител против идиотопов данного белка. Эти антитела (At_2) можно обозначить формулой p_1, i_1 . Высокие концентрации антител At_2 обладают супрессирующим действием. Действительно, мыши, гипериммунизированные белком A48, вырабатывают антитела против БЛ гораздо слабее и, кроме того, лучше переносят введение A48 миеломных клеток, продуцирующих A48, чем неиммунизированные животные.

Иммунизация нормальных животных антителами At_2 приводит к появлению антител At_3 , не связывающих леван, но способных связать (или связываться) антитела против белка A48. При иммунизации мышей БЛ продуцируются антитела к нему, несущие идиотипы A48, которые редко встречаются у нормальных животных в ответ на введение БЛ.

Совершенно удивительным оказался тот факт, что мыши, иммунизированные антителами At_3 , вырабатывают антитела, которые, являясь номинально At_4 , по своим свойствам чрезвычайно сходны с антителами At_2 . Оказалось, что примерно 60% молекул At_4 присоединяются к белку A48 и что у мышей, вырабатывающих эти антитела, супрессирована реакция на БЛ — подобно тому, как если бы они синтезировали антитела At_2 . Похожие результаты получились и на кроликах, где большая часть антител At_4 связывается с антителами At_1 [9].

Для объяснения этих результатов один из нас [74, 75] предложил модель регуляторной идиотипической сети, основанную на существовании регуляторных идиотопов (gi). По-видимому, gi представляют собой особую фракцию всех идиотопов и только в аутологичной системе ведут себя как иммуногены. Таким образом, большинство антител At_2 на самом деле являются антителами к gi . At_2 в отличие от At_1 обычно содержат gi . Следовательно, фракция «настоящих» антител At_3 (p_3, i_3) должна содержать лишь малую часть антител, образующихся в ответ на введение At_2 . Большая часть антител у таких мышей представляет собой или антитела типа At_1 , (p_1, gi_1), или параллельные наборы антител (p_x, gi_1). Если иммунизация проводится антителами At_3 , в ответ продуцируются антитела, связывающиеся с At_1 , так как большинство молекул At_3 экспрессируют gi (рис. 22.3). Таким образом, антитела At_2 или регуляторные Т-клетки способны играть существенную регуляторную роль, так как могут индуцировать или подавлять экспрессию клонов, обладающих различной антигенной специфичностью, но несущих общие gi . Экспрессия клонов В-клеток, обладающих gi , предпочтительнее, чем экспрессия других В-клеток, поскольку

первые, возможно, вызывают пролиферацию Т-клеток. Действительно, если новорожденным мышам ввести небольшое количество моноклональных антител против идиотипа А48, то активацию клонов, содержащих данный идиотип, будут осуществлять Т-хелперные клетки, специфичные в отношении идиотипа А48 [67].

Аналогичным образом появление идиотипов, доминирующих при данном иммунном ответе, очевидно, обусловлено не прямой стимуляцией регуляторных Т-клеток под действием антигенов микроокружения. Такие данные получены

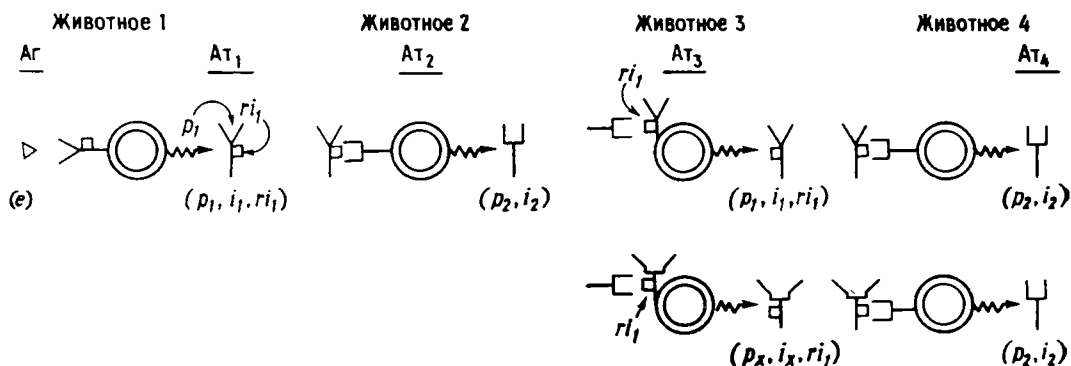


Рис. 22.3. Гипотеза регуляторных идиотипов в иммунной сети.

В основе данной гипотезы лежит предположение, что связывание рецепторов посредством их паратонов или идиотипов функционально эквивалентно и может в зависимости от условий активировать или супрессировать клетки. Гипотеза постулирует, что некоторые идиотипы, относительно часто встречающиеся среди антител, легче вызывают иммунный ответ, чем обычные идиотипы. Такие часто встречающиеся идиотипы называются регуляторными идиотипами (ri). В примере, показанном на рисунке, у животного 1 продуцируются антитела, несущие регуляторные идиотипы (ri_1) в ответ на

обычную иммунизацию. У животного 2, иммунизированного At_1 , продуцируются антитела против ri_1 (At_2). Поскольку клеток, несущих ri_1 в популяции больше, чем анти- i_2 -клеток, At_2 , использованные в качестве иммуногена (Ag), с большей вероятностью будут стимулировать ri_1 -несущие клетки. Таким образом, среди At_3 будут также преобладать ri_1 -антитела. Между тем ri_1 обнаружены на антителах с различной специфичностью, лишь малая часть которых сходна с At_1 (т. е. обладает p_1). В результате иммунизации животного 4 антителами At_3 (несущими ri_1) продуцируются At_4 , чрезвычайно сходные с At_2 . Согласно данной гипотезе, иммунная сеть конечна.

на нескольких системах (например, на системах идиотипов А5А), где показано, что примирование Т-хелперов антителами, несущими идиотип, избирательно стимулирует экспрессию клонов, обладающих таким идиотипом.

В заключение следует подчеркнуть, что, согласно этой модели, взаимодействие между клонами у неиммунизированных мышей осуществляется лишь при наличии регуляторных идиотипов; стандартные идиотипы (обычно узнаваемые лишь гетерологичными или гомологичными антителами против идиотипов) в функциональных связях не участвуют, так как концентрация их в сыворотке до иммунизации слишком мала, чтобы стимулировать идиотип-специфичные клетки. Таким образом, иммунная система представляет собой не единую взаимосвязанную сеть, а скорее состоит из функциональных идиотипических отделов, составленных из ограниченных семейств клонов, несущих регуляторные идиотипы.

22.4. Существует ли функциональная иммунная сеть?

В вопросе о функциях иммунной системы существует несколько аспектов, которые необходимо рассмотреть в связи с предполагаемой ролью идиотипической сети.

22.4.1. Различение «своего» и «не-своего»

Это основное свойство иммунной системы (которым она исходно не обладает, но которое приобретается в процессе развития) нелегко совместить с концепцией идиотипической сети. На самом деле, в основе этой концепции лежит принцип существования внутренних образов всех антигенов, что значительно осложняет попытки понять, каким образом иммунная система различает свое и чужое.

Продолжительный контакт собственных молекул с иммунной системой может, по теории сети, привести к увеличению количества идиотипов, сходных со «своими», а не с «чужими» молекулами. Стремление элиминировать антитела, реагирующие с собственными антигенами, приводит к избавлению от супрессии, оказываемой идиотопами, сходными с собственными антигенами.

22.4.2. Влияние идиотипов на развитие иммунной сети

Пассивное поступление идиотопов матери в иммунную систему плода (через плаценту) или новорожденных (с молозивом) должно влиять на распределение идиотипов, стимулируя пролиферацию клонов, продуцирующих идиотипы, сходные с доминирующими материнскими. Это предположение подтверждено экспериментально [67]. Оно крайне интересно как с физиологической, так и с теоретической точки зрения. Что касается физиологического аспекта проблемы, то ясно, что перенос иммунологического статуса от матери к потомству, приводящий к пролиферации предшественников, способных к наиболее активному ответу на антиген, должен давать потомству очевидные преимущества. Действительно, было замечено, что инфицирование человеческой популяции патогенным агентом, с которым не сталкивались предыдущие поколения, часто приводят к широкому распространению эпидемий.

В теоретическом смысле такой перенос приобретенного иммунитета, отличный от простого усвоения материнских антител, является примером подготовки иммунной системы к интенсивному ответу на антигены, с которыми сталкивалась мать.

22.4.3. Длительная память

Иммунологи часто поражаются замечательной способности иммунной системы к длительной памяти. Такая память возможна лишь благодаря комбинации механизмов, включающих хранение антигена, существование популяции лимфоцитов и постоянное поддержание отдельных клонов клеток.

Идиотипические сети [76, 78], обладающие способностью к постоянной эндогенной стимуляции, в принципе могут участвовать в поддержании длительной иммунологической памяти.

22.4.4. Тонкая настройка иммунной системы

Введение одного или нескольких антигенов животному может в принципе приводить к возникновению большого разнообразия антител, обладающих множеством паратопов, реагирующих с различным сродством со всеми эпитопами

иммунной системы. Число таких потенциальных эпитопов может быть очень велико. Вопрос состоит в том, почему иммунная система не стимулируется всеми эпитопами данного эпитипа или почему, напротив, она может быть иммунизирована антигенными детерминантами, возникающими в результате взаимодействия собственного и чужого антигена.

Идиотипические взаимодействия могут существенно ограничить набор клонов, стимулируемых данным антигеном. Таким путем достигается значительная экономия в реакции иммунного ответа, приводящая к нейтрализации «чужих» макромолекул при минимальном использовании всего разнообразия клонов иммунной системы. Какой именно клон будет выбран для ответа на антиген, зависит от генотипа организма, хода эволюции иммунной системы вида, к которому относится данный организм, и способности к стимуляции клонов регуляторных Т-клеток, особенно Т-клеток, специфичных для изотипических, аллотипических и идиотипических детерминант молекул Ig.

22.4.5. Предотвращение болезней иммунных комплексов

Данный вопрос связан с материалом, изложенным выше, так как он затрагивает роль взаимодействия идиотипа с антиидиотипом в ограничении экспрессии набора идиотипов в каждый данный момент времени. Действительно, одновременный синтез значительных количеств взаимодействующих друг с другом антигенов мог бы привести к образованию иммунных комплексов *in vivo*, а в результате к заболеванию иммунных комплексов. Способность антиидиотипических антител подавлять образование идиотипа, а также способность идиотипа подавлять образование антиидиотипа свидетельствуют о том, что идиотипическая регуляция снимает внутренний конфликт в иммунной системе, который может приводить к опасным последствиям. Нарушение такой регуляции может привести к патологическим изменениям в иммунной системе, например, в случае криоглобулинемии, обусловленной взаимодействием идиотипа с антиидиотипом [79].

В заключение мы хотели бы подчеркнуть, что дерзкая концепция иммунной сети позволила выявить целый ряд фактов, которые в противном случае остались бы неисследованными. Возникло целое направление физиологии иммунной системы, связанное с механизмом идиотипической регуляции. Пределы этой области исследования и ее точные характеристики еще не полностью выяснены, однако такая информация будет несомненно получена в ближайшее время.

Благодарности

Эта работа субсидировалась из фондов Public Health Research (грант A118316 и AG/A1027601 Ai) и National Science Foundation (грант PCM8 1105788).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jerne N. K., Toward a network theory of the immune system, *Ann. Immunol. (Paris)*, 125C, 373—389 (1974).
2. Kunkel H. G., Mannik M., Williams R. C. Individual antigenic specificities of isolated antibodies, *Science*, 140, 1218—1219 (1963).
3. Oudin J., Michel M. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines γ du serum de lapin, apparemment liée à la fonction et à la spécificité des anticorps, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 257, 805—808 (1963).
4. Rodkey S. Studies of idiotypic antibodies production and characterization of auto-antiidiotypic sera, *J. Exp. Med.*, 139, 712—719 (1974).
5. Sakato N., Eisen H. N. Antibodies to idiotypes of isologous immunoglobulins, *J. Exp. Med.*, 141, 1411—1426 (1975).

6. Cosenza H., Julius M. H., Augustin A. A. Idiotypes as variable region markers analogies between receptors of phosphorylcholine-specific T and B cells, *Transplant. Rev.*, **34**, 3—34 (1978).
7. Bona C., Heber-Katz H., Paul W. E. Idiotypic-antiidiotypic regulation I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of autoanti-(antid) antibodies and to activation of silent clones, *J. Exp. Med.*, **153**, 951—967 (1981).
8. Richter P. H. A network theory of the immune system, *Eur. J. Immunol.*, **5**, 350—354 (1975).
9. Wikler M., Franssen J. D., Collignon C., Leo O., Mariame B., van de Walle P., de Groot D., Urbain J. Idiotypic regulation of the immune system, *J. Exp. Med.*, **150**, 184—195 (1979).
10. Germain R. N., Sy M.-S., Rock K., Dietz M. H., Green M. I., Nisonoff A., Winberger J. Z., Ju S.-T., Dorf M. E., Benacerof B. The role of idotype and the MHC in suppressor T cell pathways. In: Janeway Ch., Sercarz E. E., Wigzell H., eds. *Immunoglobulin Idiotypes*, Academic Press, New York, pp. 709—723, 1981.
11. Lindemann J. Homobodies: Do they exist? *Ann. Immunol. (Paris)* **130C**, 311—319 (1979).
12. Bona C., Finley S., Waters S., Kunkel H. G. Anti-immunoglobulin antibodies III. Properties of sequential anti-idiotypic antibodies to heterologous anti- γ -globulins. Detection of reactivity of antibodies with epitopes of Fc fragments (homobodies) and with epitopes and idiotopes (epibodies), *J. Exp. Med.*, **156**, 986—999 (1982).
13. Sege K., Peterson P. A. Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2443—2447 (1978).
14. Schreiber A. B., Couraud P. O., Andre Cl., Vray B., Strosberg A. D. Anti-alprenolol anti-idiotypic antibodies bind to β adrenergic receptors and modulate catecholamine-sensitive adenylate cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7385—7389 (1980).
15. Marasco W. A., Becker E. E. Antiidiotypic as antibody against formyl-peptide receptor of the neutrophil, *J. Immunol.*, **128**, 463—468 (1982).
16. Nepom J. T., Weiner H. L., Dichter H. A., Tardieu M., Spriggs D. R., Gramm C. F., Powers M. L., Fields B. N., Greene M. I. Identification of a hemagglutinin-specific idiotypic associated with rheovirus recognition shared by lymphoid and neural cells, *J. Exp. Med.*, **155**, 155—167 (1982).
17. Jerne N. K., Roland J., Cazenave P. A. Recurrent idiotypes and internal images, *Eur. Molec. Biol. J.*, **1**, 243—247 (1982).
18. Oudin J., Cazenave P. A. Similar idiotypic specificities in immunoglobulin fractions with different anti-idiotypic functions or even without detectable antibody function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2616—2620 (1971).
19. Bona C., Mond J., Stein K. E., House S., Lieberman R., Paul W. E. Immune response to levan III. The capacity to produce anti-inulin antibodies and crossreactive idiotypes appears late in ontogeny, *J. Immunol.*, **123**, 1484—1490 (1979).
20. Liu Y.-N., Bona C., Schulman J. L. Idiotypic of clonal responses to influenza virus hemagglutinin, *J. Exp. Med.*, **154**, 1525—1538 (1981).
21. Dzierzak E. A., Janeway C. A. Expression of an idiotypic (Id-460) during in vivo anti-dinitrophenyl antibody responses III. Detection of Id-460 in normal serum that does not bind dinitrophenyl, *J. Exp. Med.*, **154**, 1442—1445 (1981).
22. Zeldis J. B., Konigsberg W. H., Richards F. F., Rosenstein R. W. The location and expression of idiotypic determinants in the immunoglobulin variable region III. Expression of the protein 315 and 460 idiotypic determinants in mouse anti-DNP antibodies, *Mol. Immunol.*, **16**, 657—664 (1979).
23. Bona C., Hooghe R., Cazenave P. A., Leguern C., Paul W. E. Cellular basis of regulation of expression of idiotypic II. Immunity to anti-MORC460 idiotypic antibodies increases the level of anti-trinitrophenyl antibodies bearing 460 idiotypes, *J. Exp. Med.*, **149**, 815—823 (1979).
24. Cazenave P. A., Ternynck T., Avrameas S. Similar idiotypes in antibody-forming cells and in cells synthesizing immunoglobulins without detectable antibody function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4500—4502 (1976).
25. Avrameas S., Antoine J. C., Ternynck T., Petit C. Development of immunoglobulin and antibody-forming cells in different stages of the immune response, *Ann. Immunol. (Paris)*, **127**, 551—571 (1976).
26. Eichmann K., Coutinho A., Melchers F. Absolute frequencies of lipopolysaccharide-reactive B cells producing A5A idiotypic in unprimed, anti-A5A idiotypic-sensitized and anti-A5A idiotypic-suppressed A/J mice, *J. Exp. Med.*, **146**, 1436—1449 (1977).
27. Wysocki L., Sato V. L. The strain A anti-p-azophenylarsonate major crossreactive idiotypic family includes members with no reactivity toward p-azophenylarsonate, *Eur. J. Immunol.*, **11**, 832, (1981).
28. Bluestone J. A., Epstein S. L., Ozato K., Scharrow S. D., Sachs D. Anti-idiotypes to mono-

- clonal anti-H-2 antibodies II. Expression of anti-H-2K^k idiotypes on antibodies induced by anti-idiotypic or H-2K^k antigen, *J. Exp. Med.*, 154, 1305—1318 (1981).
29. Kabat E. A. Origins of antibody complementarity and specificity-hypervariable regions and the minigenes hypothesis, *J. Immunol.*, 125, 961—970 (1980).
 30. Gearhard P. J., Johnson N. D., Douglas R., Hood L. IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts, *Nature*, 291, 29—34 (1981).
 31. Clevinger B., Schilling J., Hood L., Davie J. M. Structural correlates of crossreactive and individual idiotype determinants on murine antibodies to α (1 $\rightarrow$ 3) dextran, *J. Exp. Med.*, 151, 1059—1070 (1980).
 32. Karol R., Retchlin M., Noble R. W. Idiotypic crossreactivity between antibodies of different specificities, *J. Exp. Med.*, 148, 1488—1497 (1978).
 33. Bona C., Mongini P. K. A., Stein K. E., Paul W. E. Anti-immunoglobulin antibodies I. Expression of crossreactive idiotype and Ir gene control of the response to IgG_{2a} of the B allotype, *J. Exp. Med.*, 151, 1334—1348 (1980).
 34. Metzger D. W., Miller A., Sercarz E. E. Sharing of an idiotypic marker by monoclonal antibodies specific for distinct regions of hen lysozyme, *Nature*, 287, 540—542 (1980).
 35. Ju S.-T., Benacerraf F., Dorf M. E. Genetic control of a shared idiotype among antibodies directed to distinct specificities, *J. Exp. Med.*, 152, 170—182 (1980).
 36. Kohno Y., Berkower I., Minna J., Berzofsky J. A. Idiotypes of anti-myoglobulin antibodies: Shared idiotypes among monoclonal antibodies to distinct determinants of sperm whale myoglobin, *J. Immunol.*, 128, 1742—1748 (1982).
 37. Hiernaux J., Bona C. Shared idiotypes among monoclonal antibodies specific for different immunodominant sugars of lipopolysaccharide of different gram negative bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1616—1620 (1982).
 38. Bona C. Idiotypes and Lymphocytes, Academic Press, New York, 1981.
 39. Claflin J. L., Lieberman R., Davie J. M. Clonal nature of the immune response to phosphorylcholine. II. Idiotypic specificity and binding characteristics of anti-phosphorylcholine antibodies, *J. Immunol.*, 112, 1747—1756 (1974).
 40. Schuler W., Weller E., Weiler I. J. Failure of syngeneic anti-idiotypic antibody to induce idiotype suppression in neonatal BALB/c mice, *Z. Immunitätsforsch. Immunobiol.*, 153, 351 (1977).
 41. Weiler I. J., Weiler E., Springer R., Cosenza H. Idiotype suppression by maternal influence, *Eur. J. Immunol.*, 7, 591—597 (1977).
 42. Bona C., Stein K. E., Lieberman R., Paul W. E. Direct and indirect suppression induced by anti-idiotypic antibodies in the inulin-bacterial levan antigenic system, *Mol. Immunol.*, 16, 1093—1101 (1979).
 43. Bernabe R. R., Coutinho A., Cazenave P. A., Forni L. Suppression of recurrent idiotype results in profound alterations of whole B cell compartment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6416—6420 (1981).
 44. Augustin A., Cosenza A. Expression of new idiotype following neonatal idiotypic suppression of dominant clone, *Eur. J. Immunol.*, 6, 497—501 (1976).
 45. Hart D. A., Wang A. L., Pawlak L. L., Nisonoff A. Suppression of idiotypic specificities in adult mice by administration of anti-idiotypic antibody, *J. Exp. Med.*, 135, 1293—1300 (1972).
 46. Eichmann K. Idiotypic suppression. I. Influence of the dose of the effector functions of anti-idiotypic antibody on the production of an idiotype, *Eur. J. Immunol.*, 4, 296—302 (1974).
 47. Kluszens L., Kohler H. Regulation of immune response by autogenous antibodies against receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 5083—5087 (1974).
 48. Bona C., Lieberman R., House S., Green I., Paul W. E. Immune response to levan. II. T-independence of suppression of cross-reactive idiotype by anti-idiotypic antibodies, *J. Immunol.*, 122, 1614—1619 (1979).
 49. Bordenave G. R. Study of idiotype suppression in adult rabbits immunized with *Salmonella abortus-equi*, *Immunology*, 20, 635—651 (1975).
 50. Köhler H., Richardson B. C., Rowley D. A., Smyke S. Immune response to phosphorylcholine. III. Requirement of the Fc portion and equal effectiveness of IgG subclasses in anti-receptor antibody-induced suppression, *J. Immunol.*, 119, 1979—1985 (1977).
 51. Nisonoff A., Ju S.-T., Owen F. L. Studies of structure and immunosuppression of a cross-reactive idiotype in strain A mice, *Immunol. Rev.*, 34, 89—118 (1977).
 52. Eichmann K., Falk I., Rajewsky K. Recognition of idiotypes in lymphocyte interactions. II. Antigen-independent cooperation between T and B lymphocytes that possess similar and complementary idiotypes, *Eur. J. Immunol.*, 8, 853—858 (1978).
 53. Eichmann K. Expression and function of idiotypes on lymphocytes, *Adv. Immunol.*, 26, 195—254 (1978).
 54. Alevy Y. G., Bellone C. J. Anti-phenyltrimethylamino immunity in mice, *J. Exp. Med.*, 151, 528—541 (1980).

55. Kim B. S. Mechanism of idiotypic suppression. I. In vitro generation of idiotypic-specific suppressor T cells by anti-idiotypic antibodies and specific antigen, *J. Exp. Med.*, 149, 1371—1378 (1979).
56. Sy M. S., Brown A. R., Benacerraf B., Greene M. I. Antigen and receptor driven mechanisms. III. Induction of delayed-type hypersensitivity to azobenzenearsonate with anti-crossreactive idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 151, 896—909 (1980).
57. Weinberg J. Z., Germain R. N., Ju S.-T., Greene M. I., Benacerraf B., Dorf M. E. Hapten-specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. II. Demonstration of idiotypic determinants on suppressor T cells, *J. Exp. Med.*, 150, 761—776 (1979).
58. Yamamoto H., Nonaka M., Katz D. Suppression of hapten-specific delayed-type hypersensitivity in mice by idiotypic-specific suppressor T cells after administration of anti-idiotypic antibodies, *J. Exp. Med.*, 150, 818—829 (1979).
59. Thomas W. R., Morahan G., Walker I. D., Miller J. F. A. P. Induction of delayed-type hypersensitivity to azobenzenearsonate by monoclonal anti-idiotypic antibodies, *J. Exp. Med.* 153, 743—747 (1981).
60. Binz H., Fischknecht H., Shen F. W., Wigzell H. Idiotypic determinants on T-cell subpopulations, *J. Exp. Med.*, 149, 910—922 (1979).
61. Victor C., Bona C., Pernis B. Idiotypic networks, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (in press) (1983).
62. Pierce S. K., Speck N. A., Gleason K., Gearhart P., Koehler H. BALB/c T cells have the potential to recognize the TEPC 15 prototype antibody and its somatic variants, *J. Exp. Med.*, 154, 1178—1187 (1983).
63. Cerny J., Caulfield M. J. Stimulation of specific antibody-forming cells in antigen-primed nude mice by the adoptive transfer of syngeneic anti-idiotypic T cells, *J. Immunol.* 126, 2262—2266 (1981).
64. Bona C., Paul W. E. Cellular basis of expression of idiotypes. I. Suppressor cells specific for MOPC 460 idiotypic regulate the expression of cells secreting anti-TNP-antibodies bearing 460 idiotypic, *J. Exp. Med.* 149, 592—599 (1979).
65. Owen F. L., Nisonoff A. Effect of idiotypic-specific suppressor T cells on primary and secondary responses. *J. Exp. Med.* 148, 182—194 (1978).
66. Reth M., Kelsoe G., Rajewsky K. Idiotypic regulation by isologous monoclonal anti-idiotypic antibodies, *Nature*, 230, 257—259 (1981).
67. Rubinstein L., Ming Y., Bona C. Idiotypic-antiidiotypic regulation. II. Activation of A48Id silent clone by administration at birth of idiotypes is related to activation of A48Id specific helper T cells, *J. Exp. Med.* 156, 506—521 (1982).
68. Rubinstein L., Bona C. Idiotypic-antiidiotypic regulation. III. Genetic control of activation of A48Id silent clones, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (in press) (1983).
69. Hiernaux J., Bona C., Baker P. J. Neonatal treatment with low doses of anti-idiotypic antibodies leads to the expression of a silent clone, *J. Exp. Med.*, 153, 1004—1008 (1981).
70. Forni L., Coutinho A., Köhler G., Jerne N. K. IgM antibodies induce the production of antibodies of the same specificity, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77, 1125—1128 (1980).
71. Rubinstein L., Goldberg B., Hiernaux J., Stein K., Bona C. Idiotypic-antiidiotypic regulation. Requirement of the antigen or antiidiotypic challenge for the expression of clones primed at birth with minute amounts of antiidiotypic antibodies, *J. Exp. Med.* (in press) (1983).
72. Coutinho A., Forni L., Martinez C., Bernabe R. R., Larsson E. L., Reth M., Augustin A. A., Cazenave P. A. Indications for an internal regulation. In: Cohen E. P., Köhler H., eds. *The Immune System in Membranes, Receptors, and the Immune Response*, Alan R. Liss, New York, pp 279—295, 1980.
73. Paul W. E., Sredni B., Schwartz R. H. Long-term growth and cloning of nontransformed lymphocytes, *Nature*, 294, 637—639 (1981).
74. Paul W. E., Bona C. Regulatory idiotopes and immune networks: A hypothesis, *Immunol. Today*, 3, 230—234 (1982).
75. Bona C. Regulation of clonal expression through immune network. In: Schwartz L. M., ed. *Compendium of Immunology*, Van Nostrand Reinhold, New York, vol. 2, pp 223—246, 1981.
76. Herzenberg L. A., Black S. J., Herzenberg L. A. Regulatory circuits and antibody responses, *Eur. J. Immunol.* 10, 1—11 (1980).
77. Cantor H., Hugenberger J., McVay-Bourdreau L., Eardley D. D., Kerry J., Shen F. W., Gershon R. K. Immuno-regulatory circuits among T-cell sets. *J. Exp. Med.*, 148, 871—872 (1978).
78. Tada T., Okumura K., Hayakawa K., Suzuki G., Abe R., Kumagai Y. Immunological circuitry governed by MHC and V_H gene products, In: Janeway C., Sercarz E. E., Wigzell H., eds. *Immunoglobulin Idiotypes*, Academic Press, New York, pp 563—573, 1981.
79. Geltner D., Franklin E. C., Frangione B. Anti-idiotypic activity in the IgM fractions of mixed cryoglobulin, *J. Immunol.* 125, 1530—1535 (1980).

Оглавление

Часть IV. Иммуногенетика.

Глава 13. ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ, Давид Г. Сакс.	5
(Перевод А. М. Бунцевича)	5
13.1. Генетика гистосовместимости	6
13.1.1. Инбредные линии	6
13.1.2. Генетика гистосовместимости	10
13.1.3. Оценка числа генов гистосовместимости	11
13.2. Отличительные признаки <i>MHC</i>	13
13.2.1. Свойства, связанные с <i>MHC</i>	13
13.2.1.1. Сильная реакция отторжения трансплантата	13
13.2.1.2. Образование антител	15
13.2.1.3. Реакция в смешанной культуре лимфоцитов	16
13.2.1.4. Реакция трансплантат против хозяина	17
13.2.1.5. Клеточная реакция аллогенного лимфолиза	17
13.2.1.6. Связь с генами иммунного ответа	17
13.2.1.7. Рестрикция иммунного ответа	18
13.2.2. <i>MHC</i> различных видов животных	19
13.2.3. Локусы класса I и II	19
13.3. Конгенные по <i>MHC</i> и конгенные рекомбинантные линии	21
13.3.1. Принципы создания конгенной линии	21
13.3.2. Рекомбинации в пределах локуса <i>MHC</i>	24
13.4. Комплекс <i>H-2</i>	27
13.4.1. Генетическая карта комплекса <i>H-2</i>	27
13.4.1.1. Терминология	28
13.4.1.2. Области	28
13.4.1.3. Аллели	29
13.4.1.4. Гаплотип	30
13.4.1.5. Локусы	30
13.4.1.6. Специфичности	31
13.4.1.7. Несколько слов об истории терминологии	33
13.4.2. Локусы класса I	34
13.4.2.1. Компоненты	35
13.4.2.2. Химическое строение	35
13.4.2.3. Распределение по тканям	36
13.4.2.4. Серология	36
13.4.2.5. Функциональные свойства	37
13.4.2.6. Молекулярная биология	37
13.4.2.7. Мутанты класса I	38
13.4.3. Локусы класса II	39
13.4.3.1. Компоненты	39
13.4.3.2. Химическое строение	39
13.4.3.3. Распределение по тканям	40
13.4.3.4. Серология	42
13.4.3.5. Функциональные свойства	44
13.4.3.6. Молекулярная биология	44
13.4.3.7. Мутанты класса II	45
13.4.4. Другие локусы, сцепленные с <i>MHC</i>	45
13.4.4.1. Область <i>I</i>	45
13.4.4.2. Область <i>B</i>	45
13.4.4.3. Область <i>J</i>	46
13.4.4.4. Область <i>C</i>	46
13.4.4.5. Область <i>S</i>	47

13.4.4.6.	Антигены Qa и Tla	47
13.5.	Комплекс <i>HLA</i>	49
13.5.1.	Карта <i>HLA</i>	49
13.5.1.1.	Серологический анализ	50
13.5.1.2.	Генетический анализ	52
13.5.2.	Локусы класса I	54
13.5.2.1.	Компоненты	54
13.5.2.2.	Серология	55
13.5.3.	Локусы класса II	58
13.5.4.	Неравновесие по сцеплению	60
13.5.5.	Другие компоненты, сцепленные с <i>HLA</i>	62
13.5.6.	Клиническое значение типирования <i>HLA</i>	63
13.5.6.1.	Трансплантация	63
13.5.6.2.	Связь с заболеваниями	65
	Заключение	68
	Литература	68

Глава 14. АНТИГЕНЫ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ. Томас

	Дж. Киндт, Мэри Энн Робинсон (Перевод А. М. Бунцевича)	73
14.1.	Продукты главного комплекса гистосовместимости	73
14.1.1.	Реагенты и методы, используемые при выделении и обнаружении антигенов МНС	73
14.1.2.	Основные структурные особенности антигенов класса I, II и III	76
14.2.	Антигены класса I	78
14.2.1.	β_2 -Микроглобулин: субъединица молекул класса I	78
14.2.2.	Антигены HLA-A, B, C человека	80
14.2.3.	Антигены класса I мыши	83
14.2.3.1.	Сравнение структур класса I мыши	85
14.2.3.2.	Другие молекулы класса I	87
14.2.3.3.	Тимус-лейкозные антигены	88
14.2.4.	Мутантные антигены мыши и человека	89
14.2.4.1.	Мутанты H-2 мыши	89
14.2.4.2.	Функциональные варианты антигенов класса I у человека	91
14.2.5.	Взаимоотношения между антигенами класса I и иммуноглобулинами	92
14.2.6.	Гены, кодирующие антигены класса I	94
14.2.6.1.	Подходы к изучению генов класса I	94
14.2.6.2.	Организация генов класса I	95
14.2.6.3.	Организация экзонов и интронов класса I	98
14.2.6.4.	Резэкспрессия генов класса I	99
14.2.6.5.	Число генов класса I	99
14.3.	Антигены класса II	100
14.3.1.	Антигены Ia комплекса H-2 у мыши	101
14.3.2.	Антигены HLA-DR у человека	106
14.3.2.1.	Первичная структура антигенов DR	107
14.3.2.2.	Сравнение продуктов областей DR и I	108
14.3.2.3.	Полиморфизм альфа- и бета-цепей DR	109
14.3.2.4.	Серологический анализ продуктов HLA-D/DR	110
14.3.3.	Гены, кодирующие антигены класса II	111
	Заключение	113
	Литература	114

Глава 15. РОЛЬ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ В АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ КЛЕТОК. Р. Шварц (Перевод А. Ю. Руденского)

	Р. Шварц (Перевод А. Ю. Руденского)	118
15.1.	Феномен МНС-рестрикции	118
15.1.1.	МНС-рестрикция взаимодействий Т- и В-лимфоцитов	118
15.1.2.	МНС-рестрикция взаимодействия Т-лимфоцитов и макрофагов	
15.1.3.	МНС-рестрикция взаимодействия цитотоксических Т-лимфоцитов и клеток-мишеней	122
15.2.	Субпопуляции клеток гибридов F ₁ , специфичные к одному антигену и разным молекулам МНС	124
15.2.1.	Модель сближения и взаимодействия подобных структур против модели измененного «своего» или новой антигенной детерминанты	

15.2.2.	Цитотоксические Т-лимфоциты $F_1 (A \times Q)$, стимулированные вирусом у облученных животных линии А, но не линии Q, лизируют инфицированные вирусом мишени линии А	125
15.2.3.	Молекулы класса I являются элементами рестрикции, распознаваемыми цитотоксическими Т-лимфоцитами	126
15.2.4.	Исследования торможения холодными мишенями	129
15.2.5.	Выявление независимых популяций Т-лимфоцитов гибридов F_1 , специфичных к одному антигену в ассоциации с молекулами МНС класса II родительских линий	130
15.2.5.1.	Пролиферирующие Т-лимфоциты	130
15.2.5.2.	Хелперные Т-лимфоциты	132
15.2.6.	Клонирование независимых популяций Т-лимфоцитов гибридов F_1	134
15.2.7.	F_1 -специфические клоны Т-лимфоцитов	135
15.2.8.	Рестриктирующими элементами распознавания пролиферирующих Т-лимфоцитов являются МНС-молекулы класса II	135
15.2.9.	Повторное обсуждение вопроса о МНС-рестрикции взаимодействий Т- и В-клеток	136
15.2.10.	Модель МНС-рестриктированного Т-клеточного распознавания	138
15.3.	Природа МНС рестрикции: примирование или онтогенез?	139
15.3.1.	Аллогенные Т-лимфоциты и В-лимфоциты способны к эффективному взаимодействию	140
15.3.2.	Две разные МНС-рестриктированные субпопуляции Т-лимфоцитов в химерах P_1 (к. м.) $\rightarrow F_1$ (обл.)	142
15.3.3.	Гипотеза первичной иммунизации (примирования)	144
15.3.4.	Нормальные хелперные Т-лимфоциты линии А не распознают антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС	145
15.3.5.	Адаптивная дифференцировка: онтогенетическая модель происхождения МНС-рестрикции	148
15.3.6.	Цитотоксические Т-лимфоциты химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) преимущественно лизируют клетки-мишени, несущие молекулы МНС класса I мышей P_1	149
15.3.7.	Гены, кодирующие молекулы МНС класса I, определяют селекцию специфичности Т-лимфоцитов в химерах F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	150
15.3.8.	Индукторные Т-клетки химер F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) преимущественно кооперируют с В-лимфоцитами, несущими молекулы МНС класса II P_1 -мышей	151
15.3.9.	Роль тимуса в формировании МНС-рестрикции	153
15.3.10.	Значение экспериментов с химерами F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	155
15.4.	Может ли нормальная популяция Т-лимфоцитов линии А распознавать антиген в ассоциации с аллогенными молекулами МНС линии Q?	158
15.4.1.	Острое истощение и неонатальная толерантность	158
15.4.2.	Сравнение экспериментов с химерами F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.) по острому истощению и по индукции неонатальной толерантности	161
15.4.3.	Супрессия или вырожденность репертуара распознавания	163
15.4.4.	Доказательства существования супрессии в химерах F_1 (к. м.) $\rightarrow P_1$ (обл.)	164
15.4.5.	Данные о вырожденности Т-клеточного распознавания молекул МНС: измененное (аберрантное) распознавание	167
15.5.	Спорные проблемы	168
15.5.1.	Аллогенные химеры	168
15.5.2.	Бестимусные мыши	169
15.6.	Роль антиген-презентирующих клеток	173
15.7.	МНС-рестриктированные взаимодействия Т-лимфоцитов	177
15.8.	Является ли распознавание В-лимфоцитов МНС-рестриктированным?	180
15.9.	Аллореактивность	183
15.9.1.	Высокая частота аллореактивных Т-лимфоцитов	183
15.9.2.	Теоретические модели	186
15.9.3.	Репертуар Т-клеточного распознавания аллоантигенов и чужеродных антигенов перекрывается	187
15.9.3.1.	Опыты с неразделенной популяцией Т-клеток	187
15.9.3.2.	Опыты с Т-клеточными клонами	191
15.9.3.3.	Эксперименты с радиационными костномозговыми химерами	195
15.9.4.	Современное состояние вопроса	195
15.10.	Реакция смешанной сингенной культуры лейкоцитов	196

15.11.	Почему распознаются молекулы МНС	200
15.12.	Эволюция МНС	204
	Заключение	207
	Литература	208
Глава 16.	ГЕНЫ ИММУННОГО ОТВЕТА. Уильям Е. Пол (Перевод А. Ю. Руденского)	213
16.1.	Феноменология контроля, осуществляемого генами <i>Ir</i>	213
16.1.1.	Открытие генов <i>Ir</i>	213
16.1.2.	Гены <i>Ir</i> локализируются в главном комплексе гистосовместимости	214
16.1.3.	Гены <i>Ir</i> локализируются в двух различных субобластях	215
16.1.4.	Антигены, ответ на которые контролируется генами <i>Ir</i>	216
16.1.5.	Типы иммунного ответа, контролируемые генами <i>Ir</i>	216
16.1.5.1.	Т-клеточный ответ, зависящий от генов <i>Ir</i> , рестриktирован по продуктам МНС	216
16.1.5.2.	Т-клетки, специфичные к антигену в сочетании с рестриктирующими элементами неответающего гаплотипа, не выявляются	218
16.1.5.3.	Ответ цитотоксических Т-лимфоцитов контролируется генами <i>Ir</i>	219
16.2.	Природа продукта гена <i>Ir</i>	220
16.2.1.	Молекулы класса II несут гистотопы, распознаваемые МНС-рестриktированными Т-лимфоцитами	220
16.2.2.	Молекулы класса II рестриктируют иммунный ответ, контролируемый генами <i>Ir</i>	221
16.2.3.	Молекулы МНС класса II являются продуктами генов <i>Ir</i>	224
16.3.	Механизмы действия генов <i>Ir</i> и их продуктов	225
16.3.1.	Типы клеток, в которых экспрессируются гены <i>Ir</i>	225
16.3.2.	Является ли иммунореактивность, контролируемая генами <i>Ir</i> , врожденной или приобретенной?	226
16.3.2.1.	Использование радиационных костномозговых химер	227
16.3.2.2.	Химеры $NR \rightarrow F_1 (R \times NR)$	227
16.3.2.3.	Химеры $F_1 (R \times NR) \rightarrow NR$	228
16.3.2.4.	Значение тимуса как места селекции Т-лимфоцитов	229
16.3.2.5.	Первичная иммунизация Т-клеток неответающей (NR) линии антигеном в присутствии АПК отвечающей (R) линии	229
16.3.2.6.	Роль среды дифференцировки в детерминировании Ig-фенотипа	230
16.3.3.	Теории <i>Ir</i> -генового контроля	230
16.3.3.1.	Теории <i>Ir</i> -генового контроля, связанного с отсутствием пар	231
16.3.3.2.	Данные, подтверждающие гипотезу о специфическом взаимодействии антигена и молекул класса II	231
16.3.3.3.	Пары антигена и молекулы класса II могут образовываться, но с этим не связана активность определяемая генами <i>Ir</i>	233
16.3.3.4.	«Дыры» в репертуаре Т-клеточного распознавания	233
16.3.3.5.	Распознавание пар антигена и рестриктирующего элемента может быть ограничено разнообразием Т-клеточных рецепторов	234
16.3.3.6.	Отсутствие ответа может быть связано с индукцией толерантности к паре аутологичного антигена и собственного рестриктирующего элемента	235
16.3.3.7.	Супрессорные Т-клетки могут подавлять ответ на некоторые пары антиген — рестриктирующий элемент	236
	Заключение	237
	Литература	237
Глава 17.	АНТИГЕНЫ ЛИМФОЦИТОВ. П. Марк Хогарт, Ян Ф. Ц. Мак-Кензи (Перевод А. А. Нейфаха)	241
17.1.	Классификация антигенов мышиных лимфоцитов	242
17.2.	Определения и принципы получения и анализа антител	242
17.2.1.	Определения	242
17.2.2.	Методы	243
17.2.3.	Принципы и проблемы	244
17.3.	Описание мембранных антигенов клеток мыши	245
17.3.1.	Аллоантигены, обнаруживаемые либо на Т-лимфоцитах, либо как на Т-, так и на В-клетках	245
17.3.1.1.	<i>Thy-1</i>	245
17.3.1.2.	<i>Thy-2</i>	246
17.3.1.3.	<i>Ly-1</i>	249

17.3.1.4.	<i>Ly-2/3</i>	252
17.3.1.5.	<i>Ly-4</i>	253
17.3.1.6.	<i>Ly-5</i> (T200)	254
17.3.1.7.	<i>Ly-6</i>	255
17.3.1.8.	<i>Ly-7</i>	256
17.3.1.9.	<i>Ly-9</i>	257
17.3.1.10.	<i>Ly-m10</i>	257
17.3.1.11.	<i>Ly-11, Ly-12, Ly-13, Ly-14</i>	257
17.3.1.12.	<i>Ly-11</i>	258
17.3.1.13.	<i>Ly-12</i>	258
17.3.1.14.	<i>Ly-13</i>	258
17.3.1.15.	<i>Ly-14</i>	258
17.3.1.16.	<i>Ly-15</i>	258
17.3.1.17.	<i>Ly-m11</i>	258
17.3.1.18.	<i>Ly-16</i>	259
17.3.1.19.	<i>Ly-m18</i>	259
17.3.1.20.	<i>Ly-m19</i>	259
17.3.1.21.	<i>Lna-1</i> (аллоантиген-1 лимфатических узлов)	259
17.3.2.	Аллоантигены, специфичные для В-лимфоцитов	260
17.3.2.1.	<i>Lyb-2</i>	260
17.3.2.2.	<i>SBA/N</i> и мутация <i>xid</i>	261
17.3.2.3.	<i>Lyb-3</i>	261
17.3.2.4.	<i>Lyb-4</i>	262
17.3.2.5.	<i>Lyb-5</i>	262
17.3.2.6.	<i>Lyb-6</i>	262
17.3.2.7.	<i>Lyb-7</i>	263
17.3.2.8.	<i>Lyb-17, Lyb-m20</i>	263
17.3.2.9.	Антигены плазматических клеток PC-1, PC-2	263
17.3.2.10.	<i>LyM-1</i>	264
17.4.	Прочие антигены лимфоцитов	264
17.4.1.	<i>H-Y</i>	264
17.4.2.	<i>Ly-X</i>	265
17.4.3.	Антигены природных киллеров	265
17.4.4.	Ксеноантигены	266
17.4.5.	Аллоантигены лимфоцитов и вирус мышиной лейкемии (BMJL)	266
17.5.	Функциональные исследования	267
17.5.1.	Хелперные Т-клетки (<i>T_H</i> , <i>T_H</i>)	268
17.5.2.	Клетки гиперчувствительности замедленного типа (<i>T_H2</i>)	268
17.5.3.	Клетки, участвующие в отторжении трансплантата (<i>T_{OT}</i> , <i>T_{GR}</i>)	268
17.5.4.	Цитотоксические Т-клетки (<i>T_C</i>)	269
17.5.5.	Супрессорные Т-клетки (<i>T_S</i>)	269
17.5.6.	Регуляторные Т-клетки	269
17.5.7.	Реакции Т-клеток на митогены	269
17.6.	Субпопуляции лимфоцитов у человека	270
	Заключение	271
	Литература	272

Часть V. Регуляция иммунного ответа.

Глава 18. ХЕЛПЕРНЫЕ ВЛИЯНИЯ, СУПРЕССИЯ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

18.1.	Томио Тада. (Перевод А. Ю. Руденского)	275
18.1.1.	Клеточные взаимодействия в регуляции антительного ответа: краткий обзор	275
18.1.1.1.	Когнатное взаимодействие или сочетанное распознавание	276
18.1.1.2.	Поликлональное взаимодействие или несочетанное распознавание	277
18.1.1.3.	Ig-рестриктированные или антиидиотипические взаимодействия	277
18.2.	Хелперные Т-клетки	278
18.2.1.	Открытие взаимодействий Т- и В-лимфоцитов при иммунном ответе	278
18.2.1.1.	Синергизм клеток тимуса и костного мозга	279
18.2.1.2.	Эффект носителя	280
18.3.	Виды хелперных взаимодействий	282
18.3.1.	Когнатные и некогатные хелперные взаимодействия	282
18.3.2.	Гетерогенность хелперных Т-клеток	283
18.3.2.1.	Т-клетки, специфичные к носителю	284

18.3.2.2.	Т-хелперы, специфичные к IgG	285
18.3.3.	МНС-рестрикция при взаимодействии Т-хелперов и В-лимфоцитов	288
18.4.	Генерация хелперных Т-клеток	293
18.5.	Частота предшественников хелперных Т-лимфоцитов	294
18.6.	Молекулярная основа хелперных взаимодействий: хелперные и усиливающие Т-клеточные факторы	298
18.6.1.	Неспецифические хелперные факторы, продуцируемые CTh2	298
18.6.1.1.	Неспецифические медиаторы	299
18.6.1.2.	Фактор аллогенного эффекта	299
18.6.1.3.	Фактор, заменяющий Т-клетки, или фактор дифференцировки В-лимфоцитов	300
18.6.1.4.	Факторы репликации и созревания В-лимфоцитов	300
18.6.1.5.	Фактор роста В-лимфоцитов	302
18.6.2.	Антиген-специфические Т-хелперные факторы (ThF), продуцируемые Т-клетками, специфичными к носителю	303
18.6.3.	Антиген-специфический усиливающий Т-клеточный фактор (TaF)	305
18.7.	Т-супрессоры	306
18.7.1.	Общие соображения	306
18.7.2.	Гетерогенность Т-супрессоров	308
18.8.	Антиген-неспецифические Т-супрессоры и их факторы	309
18.9.	Антиген-специфические Т-супрессоры	310
18.9.1.	Т-супрессоры, индуцируемые при толерантности	310
18.9.2.	Супрессорные Т-клетки, специфичные к Т-независимым антигенам	310
18.9.3.	Примированные антигеном Т-супрессоры	310
18.9.4.	Т-супрессоры у генетически неответающих животных	311
18.9.5.	Т-супрессоры при клеточном иммунитете	311
18.10.	Ig-специфические супрессорные Т-клетки (IgTs)	311
18.10.1.	Идиотип-специфические Т-клетки (IdTs)	311
18.10.2.	Аллотип-специфические супрессорные Т-клетки	312
18.11.	Антиген-специфические супрессорные Т-клеточные факторы	313
18.12.	Регуляторные цепи	317
18.12.1.	Цепь, включающая в себя супрессию по принципу обратной связи	317
18.12.2.	Петля усиления в супрессорной цепи	318
18.12.3.	Линейная супрессорная цепь, опосредованная идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями	319
18.12.4.	Эпитоп-специфическая супрессия	321
18.12.5.	Супрессорный эпитоп	321
18.12.6.	Контрсупрессорная цепь	323
	Обобщение и заключение	323
	Литература	325

Глава 19. РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ.	Джуди М. Тил, Норман Р. Климан. (Перевод Т. В. Великодворской)	336
19.1.	Биологическая роль различных классов иммуноглобулинов	336
19.2.	Предположения о моноклональном происхождении множественных изотипов	338
19.3.	Генетические аспекты	340
19.4.	Субпопуляции В-клеток и экспрессия изотипов	341
19.4.1.	Образование изотипов в зависимости от степени зрелости В-клеток	341
19.4.2.	Связь образования изотипов с экспрессией поверхностных Ig	342
19.4.3.	Связь образования изотипов с не-Ig-маркерами клеточной поверхности	344
19.5.	Кинетика появления изотипов при иммунном ответе: зависимость от порядка расположения генов <i>Ig</i>	345
19.6.	Роль независимой и зависимой от Т-клеток антигенной стимуляции в регуляции экспрессии изотипов	346
19.6.1.	Т-независимая стимуляция	347
19.6.2.	Т-независимые ответы	348
19.7.	Позитивная и негативная регуляция экспрессии изотипов Т-клетками	350
19.8.	Регуляторные механизмы, специфичные для классов	352
19.8.1.	Роль микроокружения при экспрессии IgA	352
19.8.2.	Роль Fc-рецепторов при экспрессии IgE	354
	Заключение	358
	Литература	359

Глава 20. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ. Грегори У. Сискинд. (Перевод Т. В. Великодворской)	362
20.1. Определения	362
20.2. История вопроса	364
20.3. Толерантность, общие сведения	365
20.3.1. Индукция толерантности	365
20.3.1.1. Доза антигена	366
20.3.1.2. Способы введения антигена	366
20.3.1.3. Свойства антигенов	367
20.3.1.4. Физиологическое состояние организма	369
20.3.1.5. Неиммуногенные и слабоиммуногенные носители	371
20.3.1.6. Неспецифическая иммунодепрессия	373
20.3.1.7. Использование химически реактивных гаптенов для индукции толерантности	374
20.3.1.8. Влияние генетических факторов на индукцию толерантности	374
20.3.1.9. Кинетика индукции толерантности	375
20.3.1.10. Образование антител при индукции толерантности	376
20.3.1.11. Индукция толерантности	376
20.3.2. Отмена толерантности	377
20.3.2.1. Могут ли лимфоидные клетки переключаться от состояния ареактивности к состоянию реактивности?	378
20.3.2.2. Спонтанная отмена толерантности	378
20.3.2.3. Экспериментально индуцированная отмена толерантности	380
20.3.2.4. Перенос нормальных или иммунных клеток	380
20.3.2.5. Элиминация толерогена	381
20.3.2.6. Использование адьювантов и стимуляторов образования «фактора»	381
20.3.2.7. Обработка цитотоксическими агентами	382
20.3.2.8. Иммунизация перекрестно-реагирующими антигенами	382
20.3.3. Антитела, продуцируемые частично толерантными животными	383
20.3.4. Антигенсвязывающие клетки у толерантных животных	384
20.4. Механизмы толерантности	385
20.4.1. Клональная делеция и клональное абортирование	386
20.4.2. Толерантность, опосредованная супрессорными Т-клетками	386
20.4.3. Толерантность, опосредованная антителами	386
20.4.4. Толерантность при антигенных перегрузках	387
20.4.5. Блокада эффекторных клеток	387
20.4.6. Антиидиотипические антитела	387
20.4.7. Блокада рецепторов	388
20.4.8. Отсутствие контрсупрессии	388
Заключение	388
Литература	389
Глава 21. РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ Т- И В-КЛЕТОК ЛИМФОКИНАМИ. Кендал А. Смит (Перевод В. А. Несмеянова)	396
21.1. Лимфокины и Т-клеточный иммунный ответ	399
21.1.1. Исторический очерк	399
21.1.2. Интерлейкин 1	401
21.1.2.1. Функциональные аспекты	401
21.1.2.2. Биохимическая характеристика	404
21.1.2.3. Дальнейшие перспективы	406
21.1.3. Интерлейкин 2	406
21.1.3.1. Функциональные аспекты	406
21.1.3.2. Биохимическая характеристика	409
21.1.3.3. Дальнейшие перспективы	411
21.1.4. Дифференцировка Т-клеток, обусловленная лимфокинами	412
21.2. Лимфокины и В-клеточный иммунный ответ	413
21.2.1. Исторический очерк	413
21.2.2. Фактор роста В-клеток	414
21.2.3. В-клеточные факторы дифференцировки	417
Заключение и дальнейшие перспективы	420
Литература	420
Глава 22. ИДИОТИПИЧЕСКИЕ СЕТИ. Константин А. Бона, Бенвенуто Пернис (Перевод А. С. Серпинской)	425
22.1. Данные, подтверждающие теорию иммунной сети	426